

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

---



**Đoàn Thị Nguyệt**

**NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH CHỐNG SUY GIẢM TRÍ NHỚ VÀ CƠ  
CHẾ TÁC DỤNG CỦA DỊCH CHIẾT HOA THIÊN LÝ (*TELOSMA  
CORDATA*) TRÊN MÔ HÌNH TẾ BÀO THẦN KINH**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

*Hà Nội - 2024*

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



**Đoàn Thị Nguyệt**

**NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH CHỐNG SUY GIẢM TRÍ NHỚ VÀ CƠ  
CHẾ TÁC DỤNG CỦA DỊCH CHIẾT HOA THIÊN LÝ (*TELOSMA  
CORDATA*) TRÊN MÔ HÌNH TẾ BÀO THẦN KINH**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Ngành: Sinh học thực nghiệm**

**Mã số: 8420114**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Nguyễn Văn Trữ

2. TS. Nguyễn Hoàng Dương

*Hà Nội - 2024*

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của chúng tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính chúng tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

**Học viên**

Nguyệt  
Đoàn Thị Nguyệt

## LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, em xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến **TS. Nguyễn Văn Trữ** - một người thầy mang đầy kinh nghiệm và nhiệt huyết, đã ân cần hướng dẫn em về chuyên môn và tạo điều kiện thuận lợi nhất trong quá trình thực hiện luận văn này.

Với sự kính trọng và biết ơn sâu sắc, em xin gửi lời cảm ơn tới **TS. Nguyễn Hoàng Dương** đã định hướng, giúp đỡ và dạy dỗ em trong suốt quá trình làm nghiên cứu. Hơn thế nữa, em cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành nhất đến **TS. Nguyễn Thị Trang Huyền** và **TS. Phạm Quang Dương** đã nhiệt tình chỉ dạy và hỗ trợ em trong khi thực hiện các kỹ thuật mới.

Em muốn bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến Lãnh đạo và các đồng nghiệp tại **Trung tâm Vật lý chất mềm & Vật lý Sinh học** - Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển công nghệ cao cũng như **Viện Công nghệ Sinh học** đã chia sẻ kinh nghiệm, tạo điều kiện thuận lợi và đưa ra những lời khuyên quý báu trong suốt thời gian em làm việc tại đây.

Tiếp theo, em xin trân trọng cảm ơn ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo cùng tất cả các thầy cô, cán bộ của **Học viện Khoa học và Công nghệ** đã hỗ trợ, giảng dạy, chia sẻ cho em các kiến thức mới và giúp em hoàn thành chương trình đào tạo.

Cuối cùng, với lòng biết ơn vô hạn, em xin được gửi lời cảm ơn tới gia đình, người thân và bạn bè đã luôn động viên, quan tâm, khích lệ em trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Luận văn được giúp đỡ về mặt kinh phí và thực hiện trong khuôn khổ Nhiệm vụ Khoa học Công nghệ Chủ tịch Viện giao cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam: "*Nghiên cứu hoạt tính cải thiện trí nhớ của dịch chiết từ các cây dược liệu nhờ khả năng ức chế acetylcholinesterase và kéo dài các sợi trục của neuron*". Mã số nhiệm vụ: CT0000.03/21-22.

Đồng thời, học viên Đoàn Thị Nguyệt được tài trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số VINIF.2023.ThS.097.

Học viên

Nguyệt  
Đoàn Thị Nguyệt

## MỤC LỤC

MỤC LỤC.....	i
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, TỪ VIẾT TẮT .....	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG .....	v
DANH MỤC HÌNH ẢNH, ĐỒ THỊ.....	vi
MỞ ĐẦU .....	1
<b>CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Tổng quan về Thiên lý (<i>Telosma cordata</i> Merr.).....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.1. Thực vật học.....</b>	<b>4</b>
1.1.1.1.Vị trí phân loại của Thiên lý.....	4
1.1.1.2.Đặc điểm thực vật.....	4
1.1.1.3.Phân bố, sinh thái.....	5
1.1.1.4.Phần cây sử dụng.....	5
<b>1.1.2.Thành phần hóa học .....</b>	<b>5</b>
1.1.2.1.Hợp chất Phenolic .....	5
1.1.2.2.Tinh dầu .....	6
1.1.2.3.Các hợp chất khác .....	8
<b>1.1.3.Tác dụng sinh học .....</b>	<b>9</b>
1.1.3.1.Tác dụng chống oxy hóa .....	9
1.1.3.2.Tác dụng kháng viêm.....	9
1.1.3.3.Tác dụng bảo vệ gan.....	9
1.1.3.4.Tác dụng trị đái tháo đường.....	10
<b>1.2. Tổng quan về chứng suy giảm trí nhớ.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.1.Khái niệm.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.2.Tình trạng suy giảm trí nhớ.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.3.Phân loại chứng sa sút trí tuệ.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3. Cấu trúc và chức năng của enzyme acetylcholinesterase (AChE) .....</b>	<b>11</b>
<b>1.4.Tác động của các yếu tố thần kinh trong các bệnh về suy giảm trí nhớ.....</b>	<b>12</b>
<b>1.5.Cây dược liệu trong điều trị chứng suy giảm trí nhớ.....</b>	<b>13</b>

1.6. Tình hình nghiên cứu trong nước.....	14
1.7. Tình hình nghiên cứu trên thế giới.....	15
<b>CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....</b>	<b>16</b>
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	16
2.1.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu .....	16
2.1.2. <i>Hóa chất và thiết bị nghiên cứu.....</i>	16
2.1.2.1. Hóa chất nghiên cứu .....	16
2.1.2.2. Thiết bị nghiên cứu .....	17
2.2. Phương pháp nghiên cứu .....	17
2.2.1. <i>Phương pháp thu mẫu .....</i>	17
2.2.2. <i>Phương pháp so sánh đặc điểm hình thái .....</i>	17
2.2.3. <i>Phương pháp sinh học phân tử .....</i>	17
2.2.4. <i>Phương pháp xử lý và chiết mẫu .....</i>	18
2.2.5. <i>Phương pháp sắc ký lớp mỏng.....</i>	18
2.2.6. <i>Phương pháp đánh giá khả năng ức chế enzyme acetylcholinesterase (AChE)</i> .....	19
2.2.5. <i>Phương pháp nuôi cấy tế bào .....</i>	19
2.2.6. <i>Phương pháp sàng lọc hoạt tính kéo dài neuron.....</i>	19
2.2.7. <i>Phương pháp đánh giá tính gây độc tế bào MTT assay.....</i>	20
2.2.8. <i>Phương pháp real-time PCR .....</i>	20
2.2.9. <i>Phương pháp western blot .....</i>	20
<b>CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>22</b>
3.1. Định danh cây Thiên lý .....	22
3.1.1. <i>Tách chiết DNA tổng số và nhân dòng các đoạn gen .....</i>	22
3.1.2. <i>Phân tích trình tự gen mẫu nghiên cứu .....</i>	24
3.2. Kết quả tạo các dịch chiết và khảo sát thành phần hóa học .....	27
3.2.1. <i>Tạo các cao chiết từ mẫu hoa Thiên lý.....</i>	27
3.2.2. <i>Khảo sát thành phần hóa học bằng sắc ký lớp mỏng .....</i>	29

<b>3.3. Sàng lọc hoạt tính ức chế enzyme AChE của mẫu dịch chiết từ hoa Thiên lý.....</b>	<b>32</b>
<b>3.4. Đánh giá khả năng gây độc và sàng lọc hoạt tính kéo dài neuron lên tế bào thần kinh.....</b>	<b>34</b>
<i>3.4.1. Đánh giá khả năng gây độc của các dịch chiết tách từ hoa Thiên lý lên tế bào thần kinh .....</i>	<i>34</i>
<i>3.4.2. Hoạt tính kéo dài neuron của các dịch chiết tách từ hoa Thiên lý lên tế bào thần kinh .....</i>	<i>34</i>
<b>3.5. Đánh giá mức độ ảnh hưởng của các mẫu lên sự biểu hiện của các gen ....</b>	<b>38</b>
<i>3.5.1. Kết quả tách chiết RNA tổng số.....</i>	<i>38</i>
<i>3.5.2. Ảnh hưởng của mẫu lên sự biểu hiện của các gen .....</i>	<i>39</i>
<b>3.6. Đánh giá mức độ ảnh hưởng của mẫu lên sự biểu hiện của các protein ....</b>	<b>40</b>
<i>3.6.1. Kết quả định lượng protein .....</i>	<i>40</i>
<i>3.6.2. Ảnh hưởng của mẫu lên sự biểu hiện của các protein .....</i>	<i>42</i>
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>45</b>
<b>DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN .....</b>	<b>46</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>47</b>
<b>PHỤ LỤC.....</b>	<b>PL1</b>

**DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, TỪ VIẾT TẮT**

Tên thường	Tên viết tắt
AChE	Enzyme acetylcholinesterase
AD	Alzheimer's disease
ACF	Aceclofenac
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BuOH	Butanol
DNA	Acid deoxyribonucleic
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EtOAc	Ethyl acetate
g	Gram
GDP	Gross Domestic Product
h	Giờ
Hex	Hexane
HTL	Hoa Thiên lý
NGF	Nerve Growth Factor
SKLM	Sắc ký lớp mỏng
TLC	Thin Layer Chromatography
V	Thể tích
v/v	Thể tích/thể tích
WHO	World Health Organization



**DANH MỤC CÁC BẢNG**

<b>Bảng 1. 1.</b> Các hợp chất Volatile tinh dầu của hoa <i>Telosma cordata</i> Merrill.....	8
<b>Bảng 1. 2.</b> Phân tích định lượng dịch chiết <i>Telosma cordata</i> .....	8
<b>Bảng 3. 1.</b> Nồng độ DNA tổng số đo bằng Nanodrop.....	23
<b>Bảng 3.2.</b> Kết quả so sánh trình tự các chỉ thị định danh trên mẫu cây nghiên cứu ..	27
<b>Bảng 3. 3.</b> Khối lượng và tỷ lệ cao chiết từ các mẫu cây Thiên lý.....	28
<b>Bảng 3. 4.</b> Kết quả giá trị IC <sub>50</sub> ức chế enzyme AChE của các mẫu nghiên cứu .....	33
<b>Bảng 3. 5.</b> Kết quả đo nồng độ RNA mẫu Thiên lý bằng Nanodrop .....	39
<b>Bảng 3. 6.</b> Kết quả đo OD của protein chuẩn các nồng độ khác nhau .....	41
<b>Bảng 3.7.</b> Nồng độ protein từ mỗi mẫu sau khi định lượng bằng kit BCA .....	42

## DANH MỤC HÌNH ẢNH, ĐỒ THỊ

<b>Hình 1. 1.</b> Hình ảnh mẫu Thiên lý.....	5
<b>Hình 1. 2.</b> Cấu trúc hóa học của các hợp chất phenolic từ dịch chiết hoa Thiên lý.....	7
<b>Hình 1. 3.</b> Cấu trúc hóa học của các thành phần chính của lá cây tía tô .....	13
<b>Hình 1. 4.</b> Cấu trúc hóa học các hợp chất chính trong cây rau má.....	14
<b>Hình 2. 1.</b> Hình ảnh dược liệu hoa Thiên lý.....	16
<b>Hình 3. 1.</b> Một số đặc điểm hình thái của hoa Thiên lý.....	22
<b>Hình 3. 2.</b> Kết quả điện di DNA tổng số mẫu nghiên cứu.....	23
<b>Hình 3. 3.</b> Kết quả điện di sản phẩm PCR các vùng <i>PsbA-trnH</i> , <i>matK</i> và <i>rbcL</i> của mẫu hoa .....	24
<b>Hình 3. 4.</b> Kết quả phân tích sự tương đồng của vùng <i>matK</i> của mẫu nghiên cứu với một số trình tự trên GenBank.....	24
<b>Hình 3. 5.</b> Biểu đồ hình cây về mối quan hệ phát sinh loài dựa trên trình tự nucleotide vùng gen <i>matK</i> của mẫu cây Thiên lý trong nghiên cứu.....	25
<b>Hình 3. 6.</b> Kết quả phân tích sự tương đồng của vùng <i>psbA-trnH</i> của mẫu nghiên cứu với một số trình tự trên GenBank.....	26
<b>Hình 3. 7.</b> Kết quả phân tích sự tương đồng của vùng <i>rbcL</i> của mẫu nghiên cứu với một số trình tự trên GenBank.....	26
<b>Hình 3. 8.</b> Sơ đồ chiết xuất phân đoạn mẫu hoa Thiên lý.....	28
<b>Hình 3. 9.</b> Kết quả sắc ký lớp mỏng mẫu cao chiết từ mẫu cây Thiên lý nghiên cứu.. ..	31
<b>Hình 3. 10.</b> Phần trăm ức chế enzyme acetylcholinesterase bởi các phân đoạn khác nhau của mẫu hoa Thiên lý và Berberin chloride .....	33
<b>Hình 3.11.</b> Hoạt tính gây độc tế bào của các cao chiết từ hoa Thiên lý.....	34
<b>Hình 3. 12.</b> Hoạt tính kéo dài sợi trục neurite của cao chiết hexan từ hoa Thiên lý lên tế bào thần kinh C6.....	37
<b>Hình 3. 13.</b> Mức độ biểu hiện của các gen NGF, BDNF và acetyl H3 ở tế bào thần kinh C6 được xử lý với dịch chiết hexan mẫu hoa Thiên lý. ....	40
<b>Hình 3. 14.</b> Biểu đồ xây dựng đường chuẩn BSA mẫu hoa Thiên lý.....	41

**Hình 3. 15.** Mức độ biểu hiện của một số protein ở tế bào thần kinh khi được xử lý với cao chiết hexan từ hoa Thiên lý .....43

## MỞ ĐẦU

Sa sút trí tuệ là một hội chứng đặc trưng bởi sự suy giảm chức năng nhận thức bao gồm tư duy, ghi nhớ và lập luận gây ảnh hưởng đáng kể đến cuộc sống và hoạt động hàng ngày của con người [1, 2]. Theo báo cáo của WHO năm 2022, số người mắc chứng sa sút trí tuệ trên toàn thế giới ước tính là hơn 55 triệu người và con số này được dự đoán sẽ tăng khoảng 50% vào năm 2030 và tiếp tục tăng lên 139 triệu vào năm 2050 [3]. Tỷ lệ công dân trên 65 tuổi mắc chứng sa sút trí tuệ là khoảng 7%, trong khi ở các nước phát triển, tỷ lệ này cao hơn một chút, dao động từ 8% đến 10% do tuổi thọ cao hơn. Hội chứng sa sút trí tuệ xuất hiện như một thách thức y tế và xã hội, đòi hỏi sự quan tâm khẩn cấp nhằm nghiên cứu tạo ra các sản phẩm hỗ trợ điều trị sa sút trí tuệ [4, 5].

Bệnh Alzheimer (AD) là dạng phổ biến nhất, chiếm khoảng 70% của tất cả các trường hợp mắc chứng sa sút trí tuệ [6], đặc trưng bởi sự tích tụ protein *beta-amyloid* (hình thành các amyloid plaques) và sự thoái hóa dần dần của các vi ống. Điều này dẫn đến mất kết nối khớp thần kinh, suy giảm khả năng giao tiếp và khiến các tế bào thần kinh chết theo chương trình [2]. Mặc dù chưa được hiểu rõ hoàn toàn về cơ chế sinh bệnh nhưng sự tiến triển của bệnh được cho là có liên quan đến sự hiện diện của các đám rối sợi thần kinh (neurofibrillary tangles) và sự tích tụ các mảng protein amyloid beta (*amyloid  $\beta$*  ( $A\beta$ )) có kích thước khác nhau tương ứng [7]. Đặc biệt, AD có liên quan đến việc giảm đáng kể nồng độ acetylcholine (ACh) do sự phân hủy tăng lên. ACh là chất dẫn truyền thần kinh quan trọng chịu trách nhiệm truyền tín hiệu qua khớp thần kinh. Sau khi hoàn thành vai trò truyền tín hiệu, ACh bị thủy phân thành nhóm choline và acetyl thông qua hoạt động của enzyme acetylcholinesterase (AChE) [8]. Việc sử dụng chất ức chế AChE như một phương pháp điều trị đầy hứa hẹn để kiểm soát các bệnh liên quan đến thoái hóa thần kinh. Sự đa dạng của các hợp chất thứ cấp từ thực vật mang lại nguồn chất ức chế AChE đầy tiềm năng [9, 10].

Sự phát triển của neuron thần kinh đóng vai trò là bước khởi đầu quan trọng trong việc hình thành mạng lưới neuron [11]. Do đó, việc thực hiện các chiến lược tái tạo thần kinh nhằm mục đích tái cấu trúc mạng lưới thần kinh và khớp thần kinh có tiềm năng trở thành một phương pháp trị liệu cho AD. Chính vì thế, các nỗ lực khám phá và phát triển thuốc nhằm mục đích thúc đẩy sự phát triển của tế bào thần kinh là điều cần thiết để hiểu các cơ chế phân tử và phát triển các phương pháp điều trị hiệu quả đối với các tổn thương sợi trục và khớp thần kinh [12-14]. Các yếu tố thần kinh bao gồm Nerve Growth Factor (NGF), Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) và acetyl H3 được biết là có tác dụng kéo dài sợi trục neuron trong tế bào thần kinh và đóng vai trò quan trọng trong sự biệt hóa, khả năng sống sót và chức năng của tế bào thần kinh [15].

Ngày nay, các nghiên cứu về các hợp chất tự nhiên có nguồn gốc từ dược liệu có tác dụng điều trị chứng sa sút trí tuệ đang được các nhà khoa học đặc biệt quan tâm bởi tính ưu việt của chúng như không gây ra các tác dụng phụ, chi phí thấp và hoạt tính cao. Nhiều hợp chất trong số này đã chứng tỏ đặc tính bảo vệ thần kinh của chúng bằng cách ức chế acetylcholinesterase và kích thích sự phát triển của các sợi trục neuron trong tế bào thần kinh [16-18].

*Telosma cordata* (Burm. F.) Merr., thường được biết là “Thiên lý” ở Việt Nam, được phân loại vào họ Apocynaceae. Thiên lý được trồng chủ yếu ở Đông Nam Á, đặc biệt ở Việt Nam, Thái Lan và Malaysia [19, 20]. Loài cây này không chỉ được sử dụng làm thực phẩm mà còn dùng để chữa bệnh [21]. Nó có vai trò quan trọng trong y học cổ truyền, có tác dụng giảm đau, chữa lành vết thương, kiểm soát loét, đau đầu và thư giãn thần kinh [19]. Hơn nữa, Thiên lý được báo cáo là có đặc tính kháng khuẩn [22], điều trị đái tháo đường [23], và chống oxy hóa [24]. Các nghiên cứu cũng cho thấy khả năng giảm thiểu nguy cơ mắc bệnh tim mạch, chống ung thư và điều trị viêm kết mạc [25]. Thêm vào đó, ở Việt Nam, người dân bản địa đã sử dụng loại cây này làm trà thảo dược để cải thiện chất lượng giấc ngủ, điều này cho thấy tiềm năng của nó như một chất bổ sung có tác dụng an thần và bảo vệ thần kinh. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào đề cập đến hoạt động bảo vệ thần kinh và các cơ chế phân tử liên quan đến tác dụng bảo vệ thần kinh của Thiên lý (*Telosma cordata*).

Vì vậy, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài “**Nghiên cứu hoạt tính chống suy giảm trí nhớ và cơ chế tác dụng của dịch chiết hoa Thiên lý (*Telosma cordata*) trên mô hình tế bào thần kinh**” đặt ra mục tiêu cung cấp cơ sở khoa học đầy đủ và cần thiết đánh giá khả năng cải thiện suy giảm trí nhớ của dịch chiết từ hoa Thiên lý.

#### **Mục tiêu, tính mới của đề tài**

##### **Mục tiêu chung:**

Đánh giá khả năng chống suy giảm trí nhớ của dịch chiết từ hoa Thiên lý

##### **Mục tiêu cụ thể:**

- Đánh giá khả năng ức chế enzyme acetylcholinesterase của các dịch chiết từ hoa Thiên lý.
- Đánh giá khả năng kéo dài các sợi trục neuron của các dịch chiết từ hoa Thiên lý.

##### **Tính mới của đề tài:**

- Bổ sung cơ sở khoa học về hoa Thiên lý có khả năng cải thiện tình trạng sa sút trí tuệ.

- Nghiên cứu này là một trong những dự án đầu tiên thực hiện việc phân tích tổng thể, bao gồm việc xác định loài, khảo sát thành phần hóa học, sàng lọc khả năng ức chế

enzyme AChE, và sàng lọc hoạt tính kéo dài sợi trục neuron, đến việc đánh giá mức độ biểu hiện protein và gen của hoa Thiên lý được thu hái tại Sapa, Lào Cai, Việt Nam.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

### 1.1. Tổng quan về Thiên lý (*Telosma cordata* Merr.)

#### 1.1.1. Thực vật học

##### 1.1.1.1. Vị trí phân loại của Thiên lý

Theo hệ thống phân loại thực vật có hoa của Plants of the World Online thì Thiên lý có tên khoa học đầy đủ là *Telosma cordata* (Burm.f.) Merr. và được xếp vào một vị trí phân loại cụ thể như sau [26]:

Giới Thực vật (Plantae)

Ngành Streptophyta

Lớp Cỏ tháp bút (Equisetopsida)

Phân lớp Mộc lan (Magnoliidae)

Bộ Long đởm (Gentianales)

Họ Apocynaceae

Chi *Telosma*

Loài *Telosma cordata*

##### 1.1.1.2. Đặc điểm thực vật

Thiên lý là cây bụi, cây leo thân gỗ; có nhựa màu trắng đục; cần ánh sáng đầy đủ để sinh trưởng và phát triển bình thường. Lá hình trái tim, có khía ở gốc, chiều rộng lên tới 10 cm, chiều dài cuống lá đo được tới 8 cm, lá cây mọc đối, lá đơn, láng bóng; gân lá dạng lưới, có gân lông chim. Hoa mọc thành chùm theo trục, khi nở có màu xanh lục, sau chuyển sang màu vàng cam, đặc biệt có hương thơm về đêm. Cụm hoa hợp nhất; hoa từ 2 đến 15. Hoa lưỡng tính, mọc chùm. Đài hoa gồm 5 lá đài có ống ngắn, phía dưới có lông mịn như nhung. Tràng hoa gồm 5 cánh hoa hợp nhất. Bộ nhị gồm 5 nhị hoa, sợi ngắn, phần hoa dạng sáp. Nhị hoa và lá noãn hợp nhất thành một cấu trúc phức tạp, gọi là bộ nhụy; các lá noãn ở dưới tự do nhưng hợp nhất thành nhụy 5 thùy. Bao phấn có hai ngăn, các hạt phấn được nối với nhau bởi các dịch giả và thể (tuyến). Vành hoa bắt nguồn từ hai phần lõi lên được sắp xếp theo chiều dọc trên bề mặt lưng của các sợi và phát triển nhanh chóng trong giai đoạn cuối của quá trình phát triển hoa. Quả một chùm nang, hạt nhiều và nhỏ [27].



**Hình 1. 1.** Hình ảnh mẫu Thiên lý

#### *1.1.1.3. Phân bố, sinh thái*

*Telosma cordata* là một loài thực vật có hoa thuộc họ Apocynaceae, có nguồn gốc từ Trung Quốc và Đông Dương. *Telosma cordata* được biết với tên Thiên lý ở Việt Nam, ngoài ra còn có một số tên gọi phổ biến như hoa tím Trung Quốc, cây leo Cowslip, cây nho Pakalana, hoa nhà Bắc Kỳ và cây leo Bắc Kỳ. Thực vật này được trồng chủ yếu ở Đông Nam Á, đặc biệt trồng phổ biến ở các nước Việt Nam, Thái Lan và Malaysia [19, 20]. Cây mang những chùm hoa màu vàng dọc theo thân cây trong những tháng mùa hè. Những bông hoa riêng lẻ xuất hiện liên tiếp trong khoảng thời gian vài tuần, tỏa ra hương thơm nồng nàn [28]. Thiên lý không chỉ được sử dụng làm thực phẩm, mà còn nổi tiếng về dược tính [21].

#### *1.1.1.4. Phần cây sử dụng*

Phần ngọn, quả và hoa đều có thể dùng làm rau. Hoa được sử dụng trong món tráng miệng và cho mục đích trang trí. Dây leo của cây rất cứng và có thể dùng làm dây thừng. Hơn thế nữa, Thiên lý giữ một vai trò quan trọng trong y học cổ truyền, tinh dầu tách từ lá Thiên lý được sử dụng để giảm đau, chữa lành vết thương, điều trị ghẻ, kiểm soát vết loét, đau đầu và thư giãn thần kinh [19].

#### *1.1.2. Thành phần hóa học*

Hiện nay, các nghiên cứu cơ bản về thành phần hóa học của cây Thiên lý còn rất nhiều hạn chế. Những nghiên cứu chủ yếu tập trung vào thành phần tinh dầu và hoạt tính sinh học của chúng tách từ các bộ phận của cây Thiên lý.

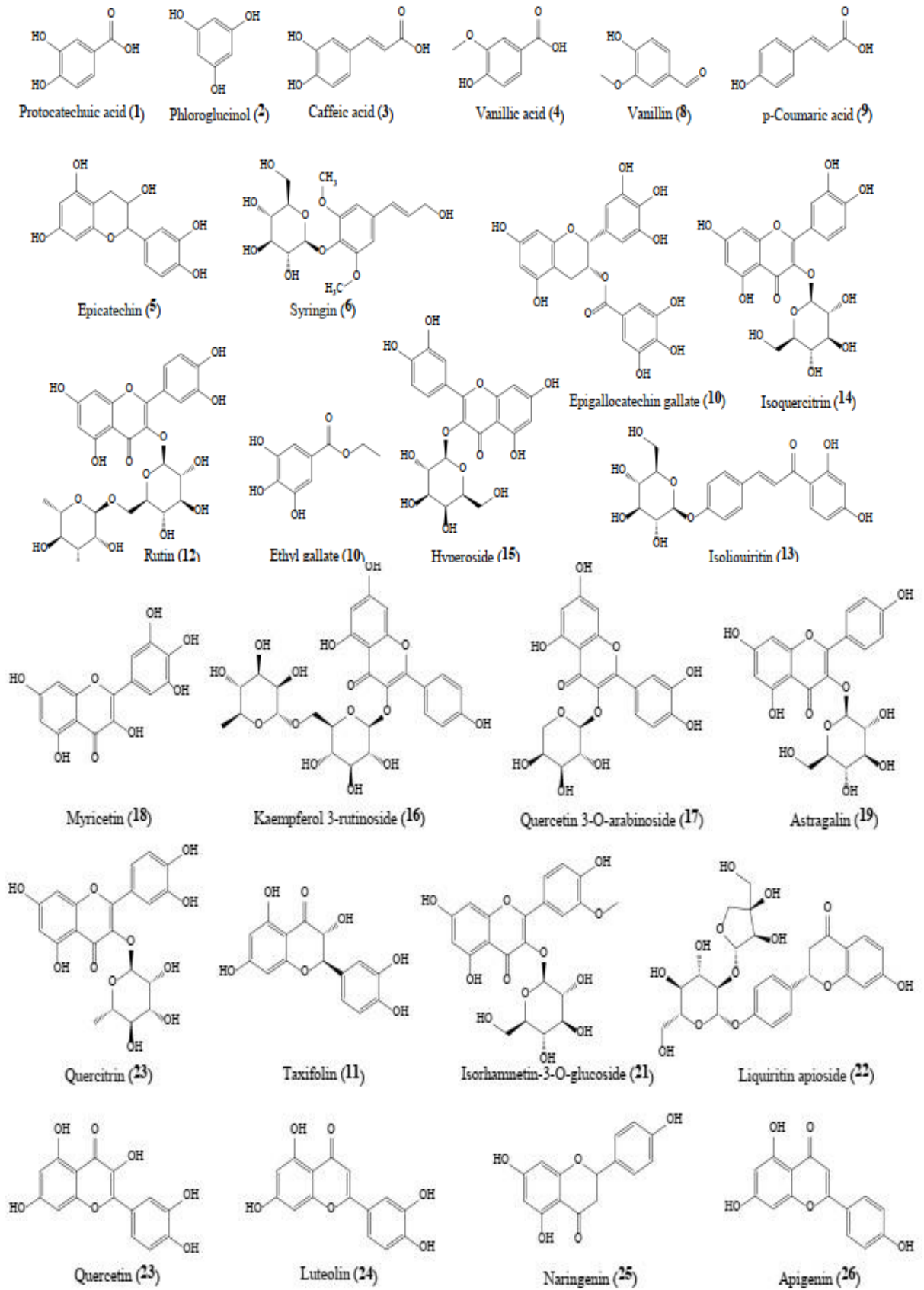
##### *1.1.2.1. Hợp chất Phenolic*



Shuai Wang và cộng sự (2022) đã công bố tổng cộng 26 hợp chất phenolic (Hình 1.2.) được sàng lọc và định lượng từ dịch chiết hoa Thiên lý, chẳng hạn như axit phenolic, flavonoid, polyphenol và dẫn xuất của axit benzoic. Rutin (**12**) là hợp chất phenolic chiếm lượng cao nhất trong dịch chiết, tiếp theo là hyperoside. Nghiên cứu cũng đã xác định được quercitrin, astragalin, isoquercitrin, và isorhamnetin-3-Oglucoside, khả năng chống oxy hóa mạnh và hoạt tính ức chế  $\alpha$ -glucosidase do các hợp chất này gây ra theo mô tả trước đây. Ngoài ra, một số các hợp chất phenolic được coi là có tiềm năng đáng kể tác dụng chống oxy hóa và chống tiểu đường, chẳng hạn như syringin (**6**), epicatechin (**5**), epigallocatechin gallate (**7**), taxifolin (**11**), isoliquiritin (**13**), kaempferol 3-rutinoside (**16**), quercetin 3-Oarabinoside (**17**), myricetin (**18**), liquiduritin apioside (**22**), quercetin (**23**), luteolin (**24**), naringenin (**25**) và apigenin (**26**), là cũng được quan sát và định lượng. Tuy nhiên, chúng chứa hàm lượng tương đối thấp mức dao động từ 0,32 đến 23,52  $\mu\text{g/g}$ . Hơn nữa, hợp chất phenolic axit protocatechuic (**1**), phloroglucinol (**2**), axit caffeic (**3**), axit vanillic (**4**), vanillin (**8**), axit p-coumaric (**9**) và etyl galat (**10**) đã được xác định và nằm trong khoảng từ 0,33 đến 53,38  $\text{g/g}$ . Những phát hiện này cung cấp cho chúng ta cơ sở khoa học để nghiên cứu chuyên sâu tiếp theo về hoạt động hạ đường huyết.

#### 1.1.2.2. Tinh dầu

Tinh dầu của hoa *Telosma cordata* thu hái tại Hawaii được điều chế bằng phương pháp chưng cất và chiết và sau đó phân tích bằng sắc ký khí (gas chromatography) và sắc ký khối phổ (gas chromatography-mass spectrometry). Tổng cộng có 43 hợp chất đã được xác định (**Bảng 1.1.**). Geraniol,  $\beta$ -ionone, dihydro-  $\beta$ -ionone, dihydro-  $\beta$ -ionol, cis- và trans-theaspirane được tìm thấy là các hợp chất chính có trong hoa của loài này [29].



**Hình 1. 2.** Cấu trúc hóa học của các hợp chất phenolic từ dịch chiết hoa Thiên lý [29]

**Bảng 1. 1.** Các hợp chất Volatile tinh dầu của hoa *Telosma cordata* Merrill. [29]

Peak no.	Compound	Peak area (%)	Kováts index
1	Acetaldehyde	3.31	716
2	Ethyl formate	1.97	833
3	Ethyl acetate	5.16	900
4	Ethanol	10.95	931
5	Isopropanol	4.02	1024
6	$\alpha$ -Pinene	0.10	1032
7	<i>n</i> -Hexanal	1.14	1091
8	$\beta$ -Pinene	0.10	1116
9	2,3-Dehydro-1,8-cineole	0.08	1201
10	1,8-Cineole	2.88	1223
11	Acetoin	11.96	1303
12	2-Methylhept-2-en-6-one	0.35	1343
13	<i>n</i> -Hexanol	0.15	1351
14	2-Acetoxybutan-3-one	0.40	1387
15	<i>cis</i> -Hex-3-en-1-ol	0.20	1392
16	<i>n</i> -Nonanal	2.28	1400
17	Acetic acid	8.42	1445
18	<i>cis</i> -Linalol oxide (furanoid)	0.96	1452
19	<i>trans</i> -Linalol oxide (furanoid)	0.25	1474
20	<i>cis</i> -Theaspirane	1.14	1509
21	<i>trans</i> -Theaspirane	0.33	1547
22	Terpinen-4-ol	0.15	1607
23	<i>cis</i> - $\beta$ -Farnesene	0.08	1617
24	$\gamma$ -Terpineol	0.23	1673
25	Neral	0.23	1686
26	$\alpha$ -Terpineol	2.66	1697
27	Geranyl acetate	0.30	1754
28	Nerol	0.68	1798
29	Dihydro- $\beta$ -ionone	3.11	1840
30	Geraniol	14.32	1848
31	$\beta$ -ionone	14.54	1947
32	Dihydro- $\beta$ -ionol	0.25	1966
33	Nerolidol	0.28	2036
34	Farnesyl acetate	0.23	2260
35	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub>	0.25	2300
36	<i>cis,cis</i> -Farnesol	0.08	2321
37	Geranic acid	0.13	2335
38	<i>cis,trans</i> -Farnesol	2.12	2350
39	Farnesyl acetone	0.20	2372
40	Benzophenone	0.18	2496
41	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	0.05	2500
42	Geranylinalol	0.15	2530
43	Benzyl benzoate	0.15	2640
Total		96.62	

### 1.1.2.3. Các hợp chất khác

Phân tích định lượng thành phần hóa học của Thiên lý chỉ ra rằng dịch chiết phân đoạn chloroform và methanol chứa hàm lượng cao flavonoid, phenol và tannin tương ứng là (57,89 và 44,82 mg RE/g), (334,64 và 296,10 GAE/g), và (301,61 và 309,56 mg GAE/g). Bên cạnh đó, dịch chiết hexan mẫu Thiên lý được báo cáo chứa thành phần phenolics, flavonoids và tannins thấp nhất. Định lượng thành phần hóa học của các phân đoạn dịch chiết khác nhau mẫu Thiên lý được thể hiện ở **Bảng 1.2.** [30].

**Bảng 1. 2.** Phân tích định lượng dịch chiết *Telosma cordata* [30]

	Total phenolic content (mg GAE/g)	Total flavonoid content (mg RE/g)	Total tannin content (mg GAE/g)
TCM	296.10 $\pm$ 3.14 <sup>b</sup>	44.82 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup>	309.56 $\pm$ 1.27 <sup>a</sup>
TCH	65.89 $\pm$ 2.19 <sup>c</sup>	20.40 $\pm$ 0.90 <sup>c</sup>	74.11 $\pm$ 2.09 <sup>d</sup>
TCEA	193.81 $\pm$ 3.90 <sup>c</sup>	28.15 $\pm$ 2.31 <sup>c</sup>	115.64 $\pm$ 1.46 <sup>c</sup>
TCC	334.64 $\pm$ 1.91 <sup>a</sup>	57.89 $\pm$ 1.77 <sup>a</sup>	301.61 $\pm$ 1.68 <sup>a</sup>
TCB	170.89 $\pm$ 1.80 <sup>d</sup>	38.92 $\pm$ 2.03 <sup>c</sup>	254.11 $\pm$ 2.41 <sup>b</sup>
TCA	289.22 $\pm$ 3.61 <sup>b</sup>	32.71 $\pm$ 1.17 <sup>d</sup>	30.77 $\pm$ 0.24 <sup>e</sup>

(Mean  $\pm$  SD); Mean with different superscripts specify significance at  $p < 0.05$

TCM: Dịch chiết methanol mẫu *Telosma cordata*; TCH: Phân đoạn hexan mẫu *Telosma cordata*; TCEA: Phân đoạn ethyl acetate mẫu *Telosma cordata*; TCC: Phân đoạn

Chloroform *Telosma cordata*; TCB: Phân đoạn Butanol *Telosma cordata*; TCA: Phân đoạn nước *Telosma cordata*.

### **1.1.3. Tác dụng sinh học**

#### **1.1.3.1. Tác dụng chống oxy hóa**

Theo Shuai Wang và cộng sự (2022) công bố dịch chiết hoa Thiên lý tồn tại hoạt tính chống oxy hóa khá cao (khả năng bắt gốc tự do ABTS và DPPH) với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là  $82,51 \pm 0,98 \mu\text{g/ml}$  và  $15,21 \pm 0,31 \mu\text{g/ml}$ . Axit ascorbic được coi là đối chứng dương, cho thấy hoạt tính bắt gốc tự do ABTS mạnh nhất với giá trị  $IC_{50}$  là  $33,94 \pm 0,39 \mu\text{g/ml}$ . Như vậy, giá trị  $IC_{50}$  của dịch chiết hoa Thiên lý cao hơn khoảng 2,4 lần so với đối chứng dương. Do đó, dịch chiết hoa Thiên lý tồn tại hoạt tính chống oxy hóa khá mạnh. DPPH là một gốc tự do ổn định tập trung vào nitơ, màu của dung dịch có tương quan dương với nồng độ của nó trong một phạm vi nhất định. Chất chống oxy hóa có thể kết hợp với gốc DPPH hoặc phản ứng thế xảy ra sẽ làm giảm nồng độ gốc DPPH và làm cho dung dịch có màu nhạt hơn. Vì vậy, khả năng khử gốc tự do DPPH có thể được đo bằng sự thay đổi độ hấp thụ. Hiệu ứng thu hồi của mẫu cho thấy xu hướng tăng nhanh khi tăng nồng độ mẫu, điều này cho thấy hoạt động phụ thuộc vào nồng độ. Khử gốc tự do DPPH cao nhất được tìm thấy trong axit ascorbic có giá trị  $IC_{50}$  là  $6,34 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$ , trong khi đó chiết xuất hoa Thiên lý cho thấy hoạt tính vừa phải ( $IC_{50} = 15,21 \pm 0,31 \mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0,01$ ), nhưng cao hơn đáng kể so với BHT (Butylated hydroxytoluene) ( $IC_{50} = 35,99 \pm 0,29 \mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0,01$ ). Như vậy, kết quả cho thấy chiết xuất hoa Thiên lý có khả năng chống oxy hóa đáng kể. Kết quả cũng cho thấy rằng hàm lượng phenolic tổng số trong mẫu hoa Thiên lý đã chứng minh mối tương quan với hoạt tính chống oxy hóa, chỉ ra rằng phenolics là thành phần hoạt tính sinh học của hoa Thiên lý [31].

#### **1.1.3.2. Tác dụng kháng viêm**

Fatima M. và cộng sự (2023) đã tiến hành đánh giá hoạt tính kháng viêm của các phân đoạn dịch chiết từ lá Thiên lý bằng phương pháp BSA (Bovine Serum Albumin). Kết quả cho thấy dịch chiết methanol lá Thiên lý cho hoạt tính kháng viêm cao nhất và phân đoạn dịch chiết hexan thấp nhất, với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là 229,7 và 797,6  $\mu\text{g/ml}$  [30].

#### **1.1.3.3. Tác dụng bảo vệ gan**

Theo tác giả Le Minh Ha (2005) công bố dịch chiết methanol của lá cây Thiên lý có tác dụng gây độc đối với tế bào ung thư gan HepG2, tế bào FL (fibril sarcoma of uterus) và tế bào RD (rhabdosarcoma) với giá trị gây độc lần lượt là 39%; 12,6% và 5,6% [32]. Nghiên cứu đánh giá tác dụng bảo vệ gan của các dịch chiết từ lá Thiên lý đối với aceclofenac (ACF) gây ra stress oxy hóa ở chuột. ACF là nguyên nhân chính gây ra sự suy giảm ( $p < 0,05$ ) mức độ chống oxy hóa và tăng markers gan. Điều trị bằng

chiết xuất Thiên lý giúp làm giảm tổn thương gan và chống oxy hóa và phục hồi các gốc tự do về mức bình thường. Hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết metanol bằng xét nghiệm DPPH cho thấy  $IC_{50}$  là 212,2  $\mu\text{g/ml}$ , và xét nghiệm BSA với  $IC_{50}$  là 229,7  $\mu\text{g/ml}$ . Kết quả cho thấy Thiên lý có tiềm năng làm thuốc chống lại các tổn thương gan [30].

#### *1.1.3.4. Tác dụng trị đái tháo đường*

Dịch chiết hoa Thiên lý cũng thể hiện hoạt tính ức chế  $\alpha$ -glucosidase rất tốt với giá trị  $IC_{50}$  là  $71,05 \pm 0,65$   $\mu\text{g/ml}$ , các thí nghiệm động học cho thấy loại ức chế  $\alpha$ -glucosidase thuộc loại hỗn hợp. Ngoài ra, 26 hợp chất phenolic đã được xác định và định lượng từ dịch chiết hoa Thiên lý bằng UPLC-MS/MS bao gồm axit phenolic, flavonoid, polyphenol và dẫn xuất của axit benzoic. Hơn nữa, việc ghép nối phân tử đã tiết lộ rằng hầu hết các hợp chất phenolic được xác định có năng lượng liên kết thấp ở mức đặc trưng của chúng. Vị trí hoạt động liên kết trong  $\alpha$ -glucosidase, cho thấy vai trò có thể có của các chất hóa học thực vật này trong các hoạt động ức chế enzyme. Những kết quả này chỉ ra rằng dịch chiết hoa Thiên lý có hoạt tính ức chế  $\alpha$ -glucosidase mạnh mẽ, có thể cung cấp lý thuyết cơ sở cho việc nghiên cứu và phát triển một loại thực phẩm chức năng hạ đường huyết [31].

## **1.2. Tổng quan về chứng suy giảm trí nhớ**

### *1.2.1. Khái niệm*

Chứng suy giảm trí nhớ hay còn gọi là sa sút trí tuệ là một hội chứng đặc trưng bởi sự suy giảm chức năng nhận thức hoặc quá trình truyền tải những thông tin và trí nhớ về vỏ não bị ngưng trệ [2].

### *1.2.2. Tình trạng suy giảm trí nhớ*

Hội chứng suy giảm trí nhớ đã tác động tiêu cực đến thể chất, tâm lý, xã hội và kinh tế, không chỉ đối với những người mắc chứng suy giảm trí nhớ mà còn đối với những người chăm sóc họ, gia đình và xã hội. Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO) 2023, có hơn 55 triệu người mắc chứng sa sút trí tuệ trên toàn thế giới, con số này dự kiến sẽ đạt khoảng 78 triệu vào năm 2030 và 139 triệu vào năm 2050. Chứng sa sút trí tuệ là kết quả của nhiều loại bệnh và chấn thương ảnh hưởng đến não. Bệnh Alzheimer là dạng sa sút trí tuệ phổ biến nhất và có thể gây ra 60–70% trường hợp. Chứng sa sút trí tuệ hiện là nguyên nhân gây tử vong đứng thứ bảy và là một trong những nguyên nhân chính gây ra tình trạng khuyết tật và sự phụ thuộc của người già trên toàn cầu. Năm 2019, chứng mất trí nhớ gây thiệt hại cho các nền kinh tế trên toàn cầu là 1,3 nghìn tỷ đô la Mỹ, khoảng 50% chi phí này là do sự chăm sóc được cung cấp bởi những người chăm sóc không chính thức [33].

### *1.2.3. Phân loại chứng sa sút trí tuệ*

Có nhiều loại chứng sa sút trí tuệ khác nhau bao gồm : Sa sút trí tuệ não mạch, bệnh thể dạng Lewy, sa sút trí tuệ hỗn hợp,... Bệnh Alzheimer (AD) là dạng phổ biến nhất, chiếm khoảng 70% của tất cả các trường hợp sa sút trí tuệ [34]. Nguyên nhân chính gây ra bệnh đó là do hai hiện tượng bất thường trong não bộ : sự tích tụ các mảng protein *amyloid beta* (amyloid plaques) và các đám rối sợi thần kinh (neurofibrillary tangles). Các mảng protein amyloid này là những khối bất thường của một loại protein gọi là *amyloid beta*. Các đám rối sợi thần kinh là một tập hợp các sợi nhỏ xoắn vào nhau, được hình thành bởi một loại protein gọi là '*tau*'. Điều này dẫn tới mất kết nối giữa các khớp thần kinh, truyền thông tin bị suy giảm và tế bào thần kinh bị chết theo chương trình [2]. Đặc biệt, AD có liên quan đến việc giảm đáng kể nồng độ acetylcholine (ACh) do sự phân hủy tăng lên. ACh là chất dẫn truyền thần kinh quan trọng chịu trách nhiệm truyền tín hiệu qua khớp thần kinh. Sau khi hoàn thành vai trò truyền tín hiệu, ACh bị thủy phân thành nhóm choline và acetyl thông qua hoạt động của enzyme acetylcholinesterase (AChE) [8]. Việc sử dụng chất ức chế AChE như một phương pháp điều trị đầy hứa hẹn để kiểm soát các bệnh liên quan đến thoái hóa thần kinh. Sự phong phú của thực vật tự nhiên mang lại nguồn chất ức chế AChE đầy tiềm năng [9, 10].

### **1.3. Cấu trúc và chức năng của enzyme acetylcholinesterase (AChE) trong bệnh suy giảm trí nhớ**

Theo Tổ chức Quốc tế Hóa sinh và Sinh học phân tử (IUBMB), AChE thuộc nhóm hydrolase hoạt động trên các liên kết ester của axit cacboxylic [35]. Phân tử AChE có hình elip với kích thước khoảng  $45 \times 60 \times 65 \text{ \AA}$ . Nó bao gồm 537 axit amin. Monomer của enzyme này là một protein  $\alpha/\beta$  bao gồm tám  $\beta$  hỗn hợp trung tâm 12 sợi được bao quanh bởi 14 chuỗi xoắn  $\alpha$ . Cấu trúc enzyme có rãnh sâu và hẹp, xuyên sâu vào nửa bên trong enzyme (dài  $20 \text{ \AA}$ ), kéo dài về phía gốc enzyme. AChE có thể tồn tại ở dạng monomer, dimer hoặc tetrameric. Ví dụ, dạng tứ phân (G4) chiếm ưu thế trong não và dạng dimeric (G2) được tìm thấy chủ yếu trên hồng cầu [36].

Các bệnh thoái hóa thần kinh thường liên quan đến hệ cholinergic, trong đó chất dẫn truyền thần kinh chính là ACh, được phân hủy bởi AChE. ACh là chất dẫn truyền thần kinh quan trọng chịu trách nhiệm truyền tín hiệu qua khớp thần kinh. Sau khi hoàn thành vai trò truyền tín hiệu, ACh bị thủy phân thành nhóm choline và acetyl thông qua hoạt động của enzyme acetylcholinesterase (AChE). Thuốc ức chế AChE thường được sử dụng để điều trị các bệnh thoái hóa thần kinh. Hơn nữa, AChE có một số chức năng khác ngoài sự phân hủy của ACh, bao gồm tham gia vào quá trình viêm, apoptosis của tế bào, chức năng tạo hình thái và bám dính, cũng như tham gia vào stress oxy hóa. Trong các bệnh thoái hóa thần kinh và rối loạn trầm cảm, tình trạng viêm, apoptosis của

tế bào và stress oxy hóa gia tăng xảy ra [37]. AChE cũng đóng một vai trò cân bằng catecholaminergic-cholinergic trong rối loạn trầm cảm [38].

#### **1.4. Tác động của các yếu tố tăng trưởng thần kinh (NGF) và yếu tố dinh dưỡng thần kinh não (BDNF) trong các bệnh về suy giảm trí nhớ**

Đầu tiên, các yếu tố thần kinh bao gồm Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Nerve Growth Factor (NGF) và acetyl H3 được biết là có tác dụng kéo dài sợi trục neuron trong tế bào thần kinh và đóng vai trò quan trọng trong sự biệt hóa, sự sống sót và chức năng của tế bào thần kinh [15].

Yếu tố tăng trưởng thần kinh (Nerve Growth Factor – NGF) là yếu tố phát triển thần kinh được xác định đầu tiên bởi Rita Levi-Montalcini và Cohen vào những năm 1950. NGF được tiết ra ở vùng vỏ não và vùng hồi hải mã, sau đó được vận chuyển ngược đến BFCN và thúc đẩy sự sống sót và biệt hóa của các tế bào thần kinh này. NGF được sản xuất với số lượng lớn các protein tiền thân có tên là pro-NGF, chứa miền pro-terminal N và miền trưởng thành ở đầu C. Pro-NGF làm trung gian cho quá trình apoptosis thông qua tương tác với p75NTR. Sự phân tách dạng pro-form và tạo liên kết không cộng hóa trị homodimers tạo ra NGF trưởng thành, hỗ trợ sự sống sót thông qua liên kết với TrkA. NGF trưởng thành cuối cùng bị phân hủy bởi metalloprotease trong không gian ngoại bào. Các nghiên cứu về bệnh lý thần kinh chỉ ra rằng tình trạng mất trí nhớ ở bệnh nhân AD có liên quan đến thoái hóa thần kinh và rối loạn chức năng của các tế bào thần kinh cholinergic. Ngoài ra, bằng chứng cho thấy mức NGF giảm là nguyên nhân gây teo cholinergic ở AD. Trong não AD, rối loạn điều hòa thụ thể NGF, cho thấy rằng sự thiếu hỗ trợ dinh dưỡng thần kinh là nguyên nhân gây suy thoái não trước. Dựa theo những phát hiện này, NGF đã được coi là một phương pháp điều trị để tái tạo hệ thống cholinergic của tế bào thần kinh. Do đó, NGF được coi là một yếu tố đóng vai trò vô cùng quan trọng trong đích điều trị chứng suy giảm trí nhớ [39-41].

Yếu tố dinh dưỡng thần kinh não (BDNF), một yếu tố khác trong họ tế bào thần kinh, làm trung gian dẻo khớp thần kinh và có vai trò quan trọng trong quá trình nhận thức, học tập và hình thành trí nhớ [42, 43]. Phân tử này có vai trò quan trọng trong sự tồn tại, duy trì và hoạt động của tế bào thần kinh. Gen BDNF được biểu hiện cao ở vỏ não, vùng hồi hải mã và vùng não trước, đóng vai trò quan trọng duy trì trí nhớ, học tập và nhận thức. Dạng Pro-BDNF liên kết với p75NTR và làm trung gian cho quá trình chết theo chương trình của tế bào, trong khi dạng trưởng thành hoạt động thông qua liên kết với TrkB. BDNF thúc đẩy sự hình thành thần kinh và dẫn truyền thần kinh qua các khớp thần kinh, nâng cao sự phát triển của khớp thần kinh, và điều chỉnh độ dẻo của khớp thần kinh [44, 45]. BDNF cũng tham gia trong việc hình thành trí nhớ bằng cách tạo ra vùng hồi hải mã điện thế. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh mức độ biểu hiện gen

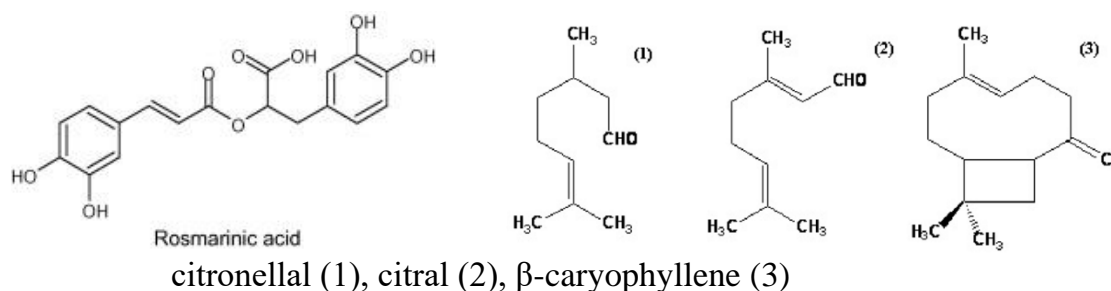
và protein BDNF có ảnh hưởng đáng kể tới tế bào thần kinh [39].

Gần đây, các nghiên cứu về các hợp chất tự nhiên có nguồn gốc từ cây thuốc đang được xem xét là một tiềm năng mới để kiểm soát các bệnh thoái hóa thần kinh và rối loạn thần kinh cho thấy sự gia tăng đáng kể. Nhiều hợp chất tách từ mẫu cây Thiên lý đã chứng tỏ đặc tính ức chế AChE và kích thích sự phát triển của các tế bào thần kinh [16-18].

### 1.5. Cây dược liệu trong điều trị chứng suy giảm trí nhớ

Bạch quả (*Ginkgo biloba* L.) với thành phần hoạt động bao gồm: terpene lactones (ginkgolides và bilobalide) và flavonoids (flavonols và flavone glycosides) [46] được sử dụng để điều trị tuần hoàn kém, mệt mỏi, chóng mặt ù tai, suy giảm trí nhớ và các triệu chứng của sa sút trí tuệ thông qua điều chỉnh nồng độ glucocorticoid, tổng hợp A $\beta$ , cân bằng nội môi và tổng hợp các yếu tố tăng trưởng, điều hòa Stress oxy hóa, bảo vệ tế bào thần kinh chống lại não thiếu máu cục bộ, tăng cường tính toàn vẹn chức năng và các tế bào nội mô mạch máu [47].

*Melissa officinalis* (cây tía tô đất) là một loại thảo dược được trồng lâu năm. Trong y học cổ truyền, tía tô đất (Lamiaceae) đã được sử dụng cách đây hơn 2000 năm, nhờ khả năng kéo dài tuổi thọ và phục hồi trí nhớ [36], [37]. Lá của loại cây này chứa monoterpenes (ví dụ như citral) có hoạt tính chống AChE yếu và axit phenol cacboxylic-axit rosmarinic, có tác dụng chống oxy hóa, chống amyloidogenic và chống nhiễm trùng. Bệnh nhân AD nhẹ đến trung bình nhận sử dụng dịch chiết xuất tía tô đất đã có được những lợi ích đáng kể trong nhận thức sau 16 tuần điều trị, không có tác dụng phụ của việc sử dụng dịch chiết từ cây tía tô đất [38]. Tía tô đất giúp điều chỉnh tâm trạng và hiệu suất nhận thức sau khi dùng thuốc cấp tính [37], [39].

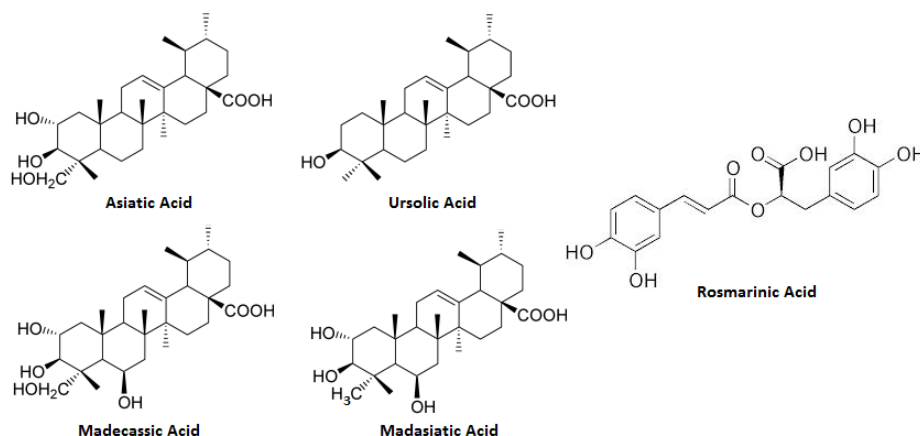


**Hình 1. 3.** Cấu trúc hóa học của các thành phần chính của lá cây tía tô

Rau má (*Centella asiatica*) với các hoạt chất saponins, asiaticosides, madecassoside, madasiatic acid, brahmoside, brahminoside, sasiaticoside, sitosterol,



tannins, ascorbic acid, centoic acid, centellic acid, thankuniside, brahmoside, brahminoside, siatic acid, thankuniside, glycoside, triterpine, thankunic acid, vellarin, asiaticosides, thankuniside, và isothankuniside, có tác dụng tăng cường trí nhớ thông qua hoạt tính chống oxy hóa. Dịch chiết từ cây rau má được chứng minh là có hiệu quả trong bảo vệ não chuột chống lại tác hại của quá trình oxy hóa do tuổi tác [48]. Asiatic acid một hợp chất được tách chiết từ cây rau má có tác dụng bảo vệ thần kinh vỏ não bằng cách tăng cường cơ chế bảo vệ oxy hóa tế bào [49].



**Hình 1. 4.** Cấu trúc hóa học các hợp chất chính trong cây rau má [48]

### 1.6. Tình hình nghiên cứu trong nước

Ở Việt Nam, việc sử dụng cây dược liệu trong hỗ trợ điều trị chứng sa sút trí tuệ đã được áp dụng từ rất lâu trong các bài thuốc y học cổ truyền.

Nguyễn Bích Hạnh và cộng sự sử dụng các phân đoạn dịch chiết Hoàng liên chân gà (*Coptis chinensis* Franch) để nghiên cứu hoạt tính ức chế acetylcholinesterase (AChE) nhằm tìm kiếm nguồn nguyên liệu để hỗ trợ và điều trị bệnh Alzheimer. Kết quả cho thấy phân đoạn dịch chiết butanol có tác dụng ức chế enzyme AChE cao ( $IC_{50}=10,44 \pm 0,16 \mu\text{g/ml}$ ) và kiểu ức chế động học enzyme hỗn hợp. Kết quả này gợi ý cho việc nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học của phân đoạn dịch chiết butanol để phân tách được hoạt chất tinh khiết có tiềm năng trong phòng, điều trị các bệnh liên quan đến Alzheimer [50].

Thêm vào đó, cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) mới được phát hiện ở Sa Pa (Lào Cai) và Đà Lạt (Lâm Đồng), đây là nguồn dược liệu quý cho y học trong điều trị bệnh Alzheimer. Nhóm nghiên cứu của tác giả Vũ Thị Ngọc và cộng sự tiến hành nghiên cứu tách chiết và phân tích hợp chất Huperzine A là hoạt chất chính trong cây Thạch tùng răng cưa được ứng dụng trong việc điều trị lâm sàng bệnh mất trí nhớ ở người cao tuổi mắc chứng Alzheimer. Kết quả cho thấy, có Huperzine A trong mẫu lá

cây Thạch tùng răng cưa và hàm lượng tương đương với kết quả phân tích mẫu Thạch tùng răng cưa của Trung Quốc. Hàm lượng Huperzine A trong mẫu lá Thạch tùng răng cưa thu hái vào mùa thu cao hơn so với mẫu thu hái vào mùa xuân là 0,0171 mg/g mẫu khô [51].

Ở Việt Nam chưa có nghiên cứu chuyên sâu nào về cơ chế tác dụng của hoa Thiên lý có hoạt tính chống bệnh suy giảm trí nhớ.

### 1.7. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

Cây Thiên lý hay còn gọi là Hoa lý, Dạ lải hương có tên khoa học là *Telosma cordata* (Burm. f.) Merrill không chỉ được sử dụng làm thực phẩm hàng ngày mà còn dùng để phục hồi cơ thể do thiếu ngủ, giúp giải nhiệt, an thần và chữa mệt mỏi đau lưng [19, 21]. Hoa là một phần quan trọng của thực vật có chứa các hợp chất chống oxy hóa tự nhiên như axit phenolic, flavonoid, anthocyanin và nhiều hợp chất phenolic khác có tác dụng cải thiện trí nhớ thông qua hoạt tính chống oxy hóa. Các hợp chất phenolic là quan trọng nhất trong hoa Thiên lý. Phenolics có tác dụng chống oxy hóa bởi khả năng loại bỏ các gốc tự do, phá vỡ chuỗi phản ứng gốc. Theo Chen Li và cộng sự (2022), chiết xuất của hoa Thiên lý có hàm lượng phenolic với giá trị  $40.51 \pm 0,72$  mg GAE/g). Nó có các hoạt động cao nhất như một chất loại bỏ gốc (ABTS và DPPH) với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là  $82.51 \pm 0.98$  và  $15.21 \pm 0.31$   $\mu$ g/ml. Thêm vào đó, dịch chiết hoa Thiên lý cũng đóng vai trò ức chế enzyme  $\alpha$ -glucosidase cao với giá trị  $IC_{50}$  đạt  $71,05 \pm 0,65$   $\mu$ g/ml, chỉ ra tiềm năng trở thành chất điều trị bệnh đái tháo đường [21]. Theo nghiên cứu của nhóm tác giả Mehreen Fatima và cộng sự (2023), dịch chiết methanol của Thiên lý có khả năng chống lại tổn thương gan trên chuột và khả năng chống oxy hóa mạnh do sự hiện diện của các polyphenol [52].

Hiện nay, chưa có nghiên cứu ở nước ngoài về hoạt tính ức chế enzyme AChE và kéo dài sợi trục neuron tế bào thần kinh của hoa Thiên lý (*Telosma cordata*).

## CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

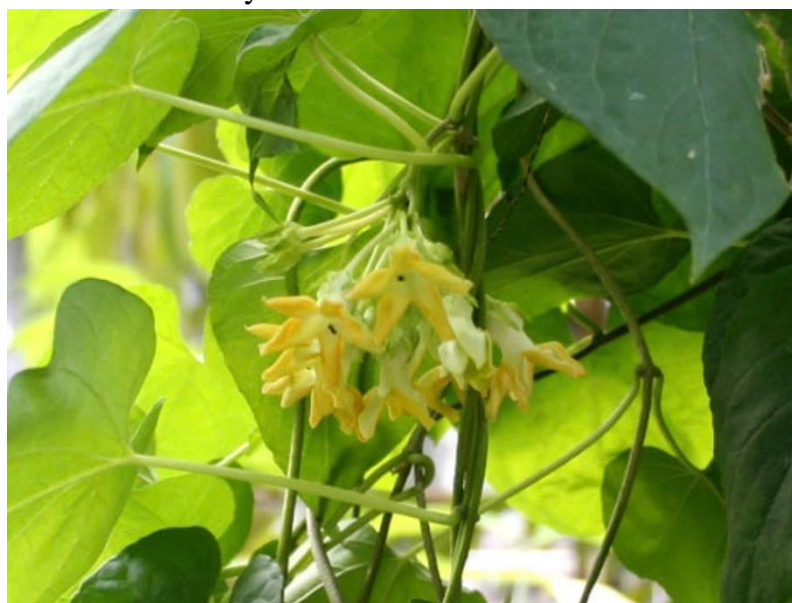
### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

#### 2.1.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: hoa Thiên lý (*Telosma cordata*) được thu hoạch tại Sa Pa, Lào Cai vào thời gian tháng 4 năm 2020.

Dòng tế bào C6 (CCL-107<sup>TM</sup>) – dòng tế bào thần kinh đệm được cung cấp bởi hãng ATCC, Mỹ.

Phạm vi nghiên cứu: Các nghiên cứu được thực hiện trên quy mô phòng thí nghiệm tại Trung tâm Vật lí Chất mềm - Vật lí Sinh học thuộc Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ cao và viện Công nghệ sinh học thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Về phạm vi nghiên cứu khoa học, đề tài này tập trung vào một số khía cạnh chính: khảo sát hoạt tính ức chế enzyme AChE, đánh giá khả năng kéo dài sợi trục neuron và đánh giá mức độ biểu hiện gen và protein liên quan đến bảo vệ thần kinh của dịch chiết hoa Thiên lý.



**Hình 2. 1.** Hình ảnh dược liệu hoa Thiên lý

#### 2.1.2. Hóa chất và thiết bị nghiên cứu

##### 2.1.2.1. Hóa chất nghiên cứu

- PCR 2X MasterMix, Ladder 1 kb plus, thuốc nhuộm Redsafe, Loading dye 6x.
- Ethanol (EtOH), methanol (MeOH), n-hexan, ethyl acetat (EtOAc), n-butanol (BuOH) (Merck) và nước cất.
- TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck), berberin clorid chuẩn (Sigma, Singapore), AChE (mã số EC 3.1.1.7) (Sigma, Singapore), Tris-HCl, Acetylthiocholine (ACTI) (Sigma, Singapore), Acid 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic (DTNB) (Sigma, Singapore).

- Môi trường nuôi tế bào DMEM, trypsin/EDTA, đệm PBS (Merck), DMSO (Merck), kháng thể sơ cấp BDNF (MA5-34960, Invitrogen), NGF (N5415, SigmaAldrich), acetyl H3 (AH01432, Invitrogen), kháng thể thứ cấp Anti-mouse IgG (B7151, SigmaAldrich).

#### 2.1.2.2. *Thiết bị nghiên cứu*

- Bể điện di, máy PCR HAIN Lifescience (Anh), máy soi gel bằng tia UV Nippon genetics (Nhật Bản).

- Cân phân tích Mettler Toledo (Thụy Sĩ), máy cô quay Daihan scientific (Hàn Quốc), dụng cụ thủy tinh: bình cầu dung tích 1000 ml, các loại cốc có mỏ dung tích 25-100 ml, phễu thủy tinh, phễu chiết quả lê, bình định mức (Trung Quốc).

- Đèn tử ngoại phát các bức xạ có bước sóng ngắn 254 nm, bình triển khai có nắp đậy kín, dụng cụ để phun thuốc thử, tủ sấy, tủ hút, máy sấy, bản mỏng sắc ký trắng Silica gel 60 F254 (Merck).

- Máy đo pH Mettler Toledo (Thụy Sĩ), máy đo quang SpectraMax iD5 Multi-Mode Microplate Readers (Mỹ), dụng cụ thủy tinh: bình cầu dung tích 1000 ml, các loại cốc có mỏ dung tích từ 25ml đến 100 ml, bình định mức, pipet chính xác.

- Tủ cấy vô khuẩn (ThermoFisher Scientific), máy ảnh, tủ nuôi tế bào, bình CO<sub>2</sub>, máy ly tâm, kính hiển vi quang học (Nikon Eclipse Ti-U, Japan).

## 2.2. **Phương pháp nghiên cứu**

### 2.2.1. **Phương pháp thu mẫu**

Mẫu hoa Thiên lý được thu hái tại Sa Pa, Lào Cai, mẫu hoa thu hái về được nhận dạng bởi chuyên gia Thực vật học tại Viện Công nghệ Sinh học-Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và so sánh với các mô tả chi tiết trong tài liệu tham khảo [53, 54]. Mẫu hoa được rửa sạch và bảo quản trong cồn để làm định danh bằng phương pháp sinh học phân tử. Lưu trữ mẫu tại phòng Vật lý Chất mềm và Vật lý Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam dùng cho thí nghiệm tiếp theo.

### 2.2.2. **Phương pháp so sánh đặc điểm hình thái**

Thu thập mẫu hoa, chọn mẫu tươi, thu thập từ các khu vực địa lý đặc trưng. Lựa chọn các đặc điểm hình thái quan trọng bao gồm: hình dáng lá, kích thước, màu sắc, hoa, quả, hình thái rễ, cũng như các đặc điểm phân biệt khác như mùi, vết cắt của lá, lông... Tham khảo một số tài liệu phân loại [55].

### 2.2.3. **Phương pháp sinh học phân tử**

Mẫu cây Thiên lý sau thu hái được tiến hành tách chiết DNA tổng số bằng phương pháp CTAB cải tiến. Sau đó, DNA tổng số được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

Trình tự DNA mẫu hoa được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng các cặp mồi *MatK*, *PsbA-trnH* và *RbcL*. Phản ứng khuếch đại các đoạn gen được tối ưu sử dụng điều kiện như sau: 20  $\mu$ l tổng thể tích bao gồm: 1  $\mu$ l DNA tổng số; 10  $\mu$ l MasterMix 2X; 1  $\mu$ l primer F; 1  $\mu$ l primer R và 7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O với chu trình nhiệt như sau: 1 chu kỳ biến tính 94 °C/ 5 phút; 35 chu kỳ (94 °C/ 45 giây; 55 °C/ 50 giây; 72 °C/ 1 phút) và bước tổng hợp cuối cùng 72 °C/ 5 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%. Cuối cùng, tinh sạch sản phẩm PCR bằng ethanol 100% và tiến hành giải trình tự bằng phương pháp Sanger [56].

#### 2.2.4. Phương pháp xử lý và chiết mẫu

Mẫu cây Thiên lý được sấy khô đến khối lượng không đổi, nghiền nhuyễn và đem ngâm chiết trong các dung môi. Phương pháp chiết xuất dược liệu được sử dụng là phương pháp chiết ngâm dần và phương pháp chiết phân bố lỏng-lỏng. Dược liệu sau khi được làm ngập trong dung môi chiết ethanol 90%, được cho vào bình thủy tinh. Đặt mẫu trong máy siêu âm, để nhiệt độ ở 55 °C trong 3 tiếng. Sau đó, tiến hành lọc mẫu cây qua giấy lọc thu dịch chiết cặn. Quá trình này lặp lại vài lần để chiết kiệt hoạt chất trong dược liệu. Kiểm tra bằng TLC với thuốc thử Vanilin đến khi không còn vết màu trên bản mỏng. Gộp tất cả dịch chiết lại, trộn đều, cô thu hồi dung môi trong điều kiện áp suất giảm ở nhiệt độ khoảng 60 °C để đuổi hết ethanol, ta thu được cao chiết toàn phần. Cao được để trong chai kín, dán nhãn và bảo quản lạnh 4 °C. Cao toàn phần của dịch chiết mẫu cây được lựa chọn, hòa tan lại trong một lượng tối thiểu cồn 90%, và lắc phân đoạn với các dung môi có độ phân cực tăng dần với tỉ lệ 1:1 (3 lần) theo thứ tự *n*-hexan, ethyl acetate (EtOAc) và *n*-butanol (*n*-BuOH). Gộp các dịch chiết của các phân đoạn dịch chiết tương ứng, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm. Thu được các phân đoạn tương ứng là dịch chiết hexan, ethyl acetate và butanol được dùng để sàng lọc hoạt tính sinh học [57, 58].

#### 2.2.5. Phương pháp sắc ký lớp mỏng

Tiến hành phân tích sắc ký lớp mỏng (TLC) của 4 dịch chiết từ hoa Thiên lý bao gồm dịch chiết ethanol (EtOH), *n*-hexan (Hex), ethyl acetate (EtOAc) và *n*-butanol (BuOH) chiết xuất từ hoa Thiên lý bằng cách sử dụng tấm TLC pha thường theo Supriya Tiwari *et al.* với một số thay đổi nhỏ [59]. Chúng tôi sử dụng tấm bản mỏng Silica gel 60 F254 HPTLC pha thường có kích thước 6 cm x 6 cm (Merck, Darmstadt, Đức) để định tính thành phần hóa học trong các dịch chiết hoa Thiên lý. Các tấm TLC được sấy ở 115°C trong 15 phút trước khi sử dụng. Sau đó, lấy 10  $\mu$ L mỗi dịch chiết chấm lên tấm silica gel bằng ống mao dẫn. Pha động để phân tích TLC đã được tối ưu hóa bằng cách thay đổi độ phân cực của nó. Điều này đạt được bằng cách bắt đầu với dung môi có độ phân cực thấp và sau đó tăng dần độ phân cực. Các hợp chất được tách ra sau đó

được hiển thị dưới ánh sáng tia cực tím ở bước sóng 254 nm, được đánh dấu trên mỗi tấm TLC bằng bút chì và chụp ảnh. Cuối cùng, các tấm TLC được ngâm trong dung dịch Vanillin và đặt nó lên một tấm gia nhiệt đã được làm nóng trước ở nhiệt độ 150°C cho đến khi xuất hiện các đốm màu có thể nhìn thấy được.

### 2.2.6. Phương pháp đánh giá khả năng ức chế enzyme acetylcholinesterase (AChE)

Để đánh giá khả năng ức chế enzyme acetylcholinesterase (AChE) dùng phương pháp đo quang *in vitro* được xây dựng đầu tiên bởi Ellman năm 1961 có thay đổi nhẹ [60]. Nguyên lý hoạt động của enzyme này là thủy phân cơ chất acetylthiocholine chloride (ACTI) tạo thành thiocholine và iodine, chất tạo ra màu vàng khi phản ứng với thuốc thử acid 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic (DTNB). Donepezil được sử dụng làm đối chứng dương trong thí nghiệm này. Phép thử được thực hiện như sau: chất thử được pha với dải nồng độ 128; 25; 5; 1 và 0,2 µg/ml được lấy vào mỗi giếng là 10 µL; 25 µL acetylthiocholine chloride (ACTI) 15mM, 125 µL thuốc thử Ellman's DTNB 3mM thêm vào phản ứng. Enzim AChE (Electric eel) được cung cấp bởi hãng Sigma pha trong đệm PBS với nồng độ 0,22 U/ml thêm vào giếng thử và giếng điều khiển dương với thể tích 25 µL. Đọc độ hấp thụ của phản ứng ở bước sóng 410 nm. Phần trăm hoạt độ enzyme được tính bằng công thức:

$$\% \text{ Ức chế enzyme} = (\text{OD}_{\text{sampe}} - \text{OD}_{\text{blank}}) / (\text{OD}_{\text{positive}} - \text{OD}_{\text{blank}}) \times 100\%$$

Trong đó :  $\text{OD}_{\text{sampe}}$  là độ hấp thụ của chất thử

$\text{OD}_{\text{blank}}$  là độ hấp thụ của giếng không có enzyme

$\text{OD}_{\text{positive}}$  là độ hấp thụ của giếng chứa enzyme

Từ giá trị % Ức chế enzyme và nồng độ mẫu tiến hành vẽ đường tuyến tính. Dựa vào đường tuyến tính, tính được  $\text{IC}_{50}$  (nồng độ mẫu mà tại đó ức chế 50% hoạt tính enzyme AChE). Mẫu có hoạt tính ức chế càng mạnh khi giá trị  $\text{IC}_{50}$  càng nhỏ.

### 2.2.5. Phương pháp nuôi cấy tế bào

Các tế bào thần kinh đệm của chuột C6 được sử dụng và nuôi trong môi trường DMEM ((Dullbecco's modified Minimum Essential Medium), có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bê Fetal Bovine Serum (FBS) và 1% dịch kháng sinh (penicillin 100 đơn vị penixilin/ml, 100 µg streptomycin sunfat/ml). Tế bào được nuôi trong tủ nuôi cấy 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ , môi trường nuôi cấy được thay đổi thường xuyên 2-5 ngày tùy theo sự phát triển của tế bào [61].

### 2.2.6. Phương pháp sàng lọc hoạt tính kéo dài neuron

Tế bào thần kinh C6 được cấy vào đĩa 24 giếng với mật độ 8000 tế bào trên giếng.

Đĩa nuôi tế bào được để ổn định qua đêm. Sau đó, các dịch chiết ethanol, hexan, ethyl acetate và butanol của hoa Thiên lý được thêm vào các giếng tương ứng với nồng độ cuối cùng 2,5 µg/ml và 5 µg/ml. Sau 24 giờ ủ, chiều dài neuron được quan sát và chụp lại dưới kính hiển vi Nikon Eclipse Ti-U, Nhật Bản dưới vật kính 20x. Ít nhất 5 vị trí được chọn ngẫu nhiên để chụp ảnh lại ở mỗi giếng. Với mỗi vùng lựa chọn, chiều dài neuron được đo trên 100 tế bào sử dụng phần mềm ImageJ. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập [11].

### **2.2.7. Phương pháp đánh giá tính gây độc tế bào MTT assay**

Phương pháp MTT assay thử hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* trên dòng tế bào thần kinh chuột C6 [62]. Tế bào thần kinh chuột C6 được cấy trên đĩa 96 giếng ở mật độ 10.000 tế bào/ giếng. Tế bào được nuôi qua đêm để tạo sự ổn định trên đĩa. Tiếp theo, hợp chất cần nghiên cứu sẽ được bổ sung với các nồng độ khác nhau từ thấp đến cao và lặp lại 3 lần. DMSO được sử dụng là đối chứng âm và thực hiện tương tự. Mẫu được ủ 24 hoặc 48h. Tiếp theo, MTT ((4,5-dimethylthiazol -2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) nồng độ 5 mg/ml (Sigma-Aldrich) được bổ sung thêm vào các giếng (10% thể tích) và được ủ trong 4 giờ ở 37 °C. Sau đó, cẩn thận loại bỏ hết môi trường. Tế bào được rửa 2 lần với đệm phosphat. Tỷ lệ sống của tế bào được đo bằng xét nghiệm MTT. Các tinh thể formazan được hòa tan trong DMSO và độ hấp thụ được đo ở 562nm. Dữ liệu được phân tích và so sánh với nhóm đối chứng. Tính độc được xác định theo công thức:

$$\text{Phần trăm gây độc} = ((\text{đối chứng} - \text{mẫu})/\text{đối chứng}) \times 100$$

### **2.2.8. Phương pháp real-time PCR**

Các tế bào thần kinh được xử lý với các dịch chiết và phân đoạn trong 24 giờ, sau đó tiến hành tách RNA tổng số từ các dòng tế bào thần kinh. RNA tổng số được sử dụng để tổng hợp cDNA. Các cặp môi đặc hiệu của các gen liên quan quá trình sinh trưởng, biệt hóa tế bào thần kinh như Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Nerve Growth Factor (NGF) được sử dụng để đánh giá mức ảnh hưởng của hợp chất lên sự biểu hiện gen (mRNA) bằng kỹ thuật Realtime PCR sử dụng bộ kit SYBR green master mix [63].

### **2.2.9. Phương pháp western blot**

Các tế bào thần kinh được xử lý với các dịch chiết và phân đoạn trong 48 giờ, tiến hành thu protein tổng số. Nồng độ protein được định lượng bằng kit BCA. Tiếp theo protein tổng số tiến hành điện di trên gel poly-acrylamide. Chuyển màng và tiến hành khóa màng bằng dung dịch BSA 3% trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng trên máy lắc nhẹ. Tiếp

theo rửa màng và gắn các kháng thể đặc hiệu cho các protein nghiên cứu như protein BDNF, NGF, acetyl H3 trong 2 giờ hoặc ủ qua đêm ở 4 °C trên máy lắc nhẹ. Rửa màng và gắn kháng thể thứ 2 (second antibody), ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa màng và hiện băng đích bằng phản ứng cơ chất trong buồng tối. Định lượng protein được xác định bằng phần mềm phân tích ảnh ImageJ, nhằm đánh giá mức độ ảnh hưởng của hợp chất lên sự biểu hiện của protein [64].

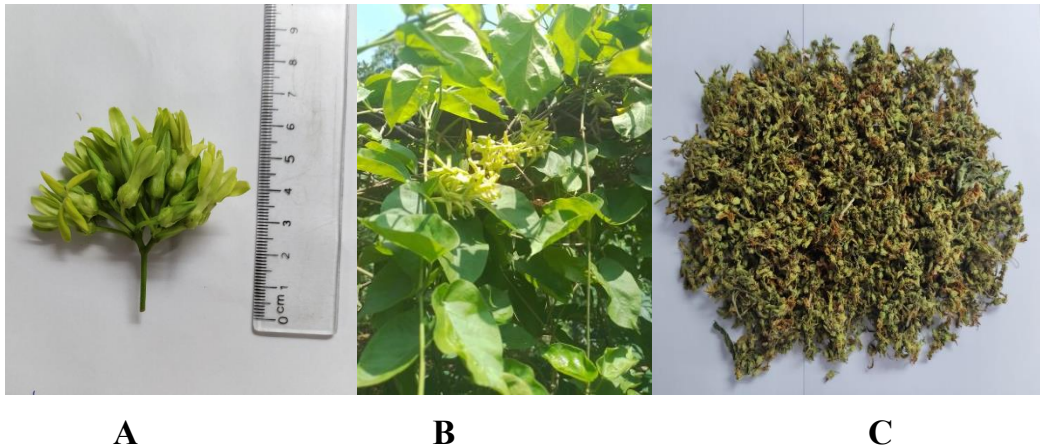


### CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Định danh cây Thiên lý

##### 3.1.1. Tách chiết DNA tổng số và nhân dòng các đoạn gen

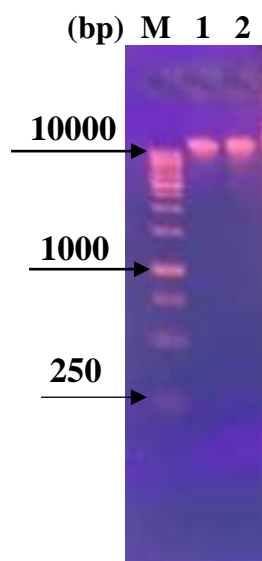
Mẫu hoa Thiên lý được thu hái tại Sa Pa, Lào Cai, Việt Nam, tại thực địa dựa trên đặc điểm hình thái, tiếp tục được khẳng định bằng phương pháp sinh học phân tử. Như kết quả ở Hình 3.1 (A-C), các mẫu thu được đã được xác định là loài Thiên lý (*Telosma cordata*) thông qua phương pháp so sánh hình thái theo Endress và cộng sự [55].



**Hình 3. 1.** Một số đặc điểm hình thái của hoa Thiên lý: (A) hoa Thiên lý sau khi thu hoạch, (B) hoa, lá và thân cây ở giai đoạn trưởng thành, (C) hoa đã khô.

Sau đó, mẫu Thiên lý tiếp tục được khẳng định bằng phương pháp sinh học phân tử bằng cách sử dụng mã vạch DNA barcoding. Kết quả chứng minh sự khuếch đại thành công mẫu hoa bằng cách sử dụng các cặp mồi đặc hiệu cho ba vùng mã vạch DNA. Chiều dài trình tự nucleotide của các mẫu thực vật cho ba vùng gen *matK*, *trnH-psbA* và *rbcL* lần lượt khoảng là 883 bp, 573 bp và 513 bp.

Đầu tiên, mẫu nghiên cứu sau thu hái được tiến hành tách chiết DNA tổng số, sản phẩm DNA tổng số sau khi tách chiết và tinh chế được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose nồng độ 1%. Có thể nhận thấy rằng mẫu DNA thu được có hình ảnh băng sắc nét, chất lượng tốt, trên giếng điện di chỉ xuất hiện một băng DNA có trọng lượng phân tử cao, đảm bảo chất lượng cho các bước nghiên cứu tiếp theo (Hình 3.2).



**Hình 3. 2.** Kết quả điện di DNA tổng số mẫu nghiên cứu (M: DNA marker 1Kb; 1,2: mẫu nghiên cứu)

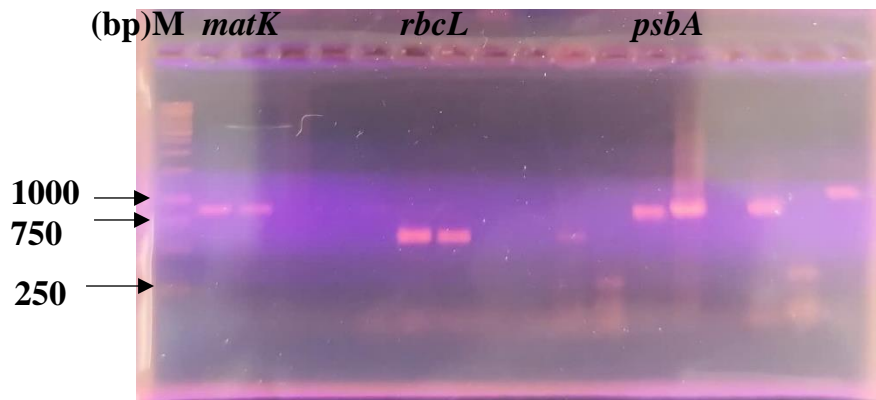
Nồng độ và chất lượng của DNA tổng số mẫu nghiên cứu được kiểm tra bằng đo mật độ quang bằng máy Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific). Giá trị được thể hiện trong Bảng 3.1.

**Bảng 3. 1.** Nồng độ DNA tổng số đo bằng Nanodrop

	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình
Nồng độ (ng/ $\mu$ l)	72,4	71,8	71,5	71,9
A260/280	1,08	1,06	1,05	

Kết quả đo nồng độ DNA có giá trị trung bình là 71,9 ng/ $\mu$ l, chỉ số A260/280 ở mức cho phép, lượng DNA đủ để giải trình tự đoạn ngắn Sanger. Vì vậy, nhóm nghiên cứu quyết định chọn mẫu DNA tổng số tiếp tục giải trình tự Sanger.

DNA tổng số của mẫu sau khi được xác định mức độ hấp thụ tử ngoại (OD) bằng máy đo quang phổ, được pha loãng tới nồng độ cần thiết để làm khuôn cho PCR với các cặp mồi đặc hiệu tương ứng. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy các cặp mồi *matK*, *psbA-trnH* và *rbcL* đã được sử dụng thành công trong việc nhân bản, khuếch đại các đoạn gen mong muốn từ DNA của mẫu cây Thiên lý. Các sản phẩm PCR này được tinh sạch sử dụng cho phản ứng xác định trình tự gen bằng phương pháp Sanger (Hình 3.3).



**Hình 3. 3.** Kết quả điện di sản phẩm PCR các vùng *PsbA-trnH*, *matK* và *rbcL* của mẫu hoa

### 3.1.2. Phân tích trình tự gen mẫu nghiên cứu

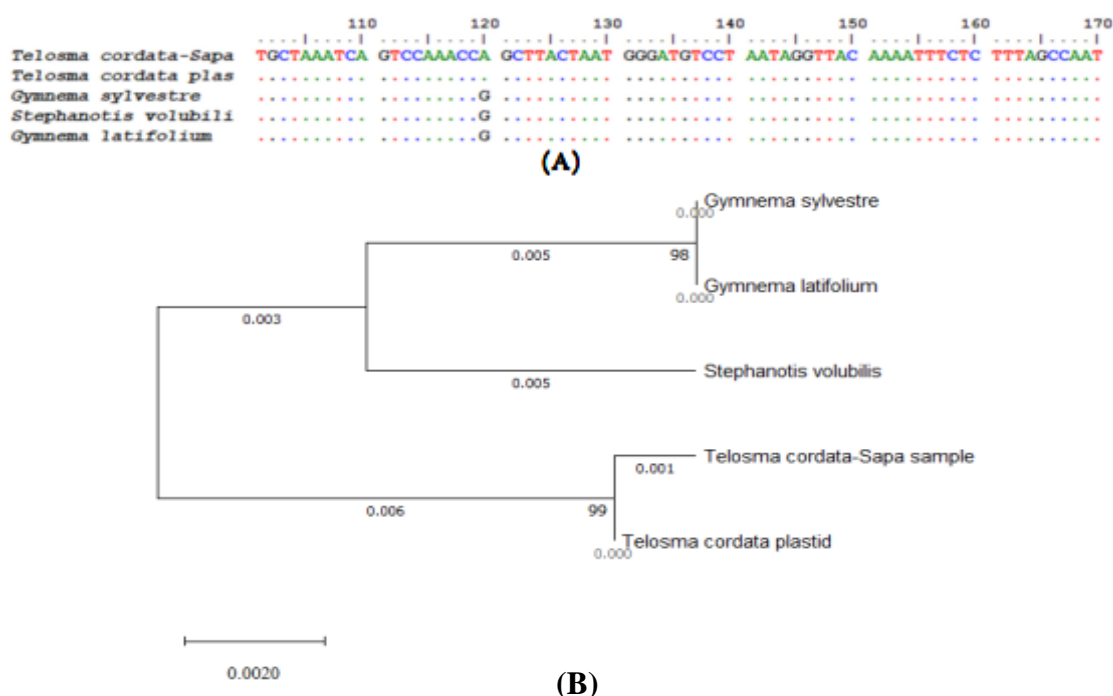
Sản phẩm PCR của mẫu nghiên cứu sau khi được tinh sạch tiến hành giải trình tự xác định tên khoa học của cây bằng phương pháp Sanger. Các trình tự thu được từ mẫu hoa đã được kiểm tra tính tương đồng với các trình tự có sẵn trên Genbank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) bằng công cụ BLAST.

Kết quả Hình 3.4 cho thấy, khi so sánh trình tự vùng gen *matK* của mẫu nghiên cứu với các trình tự được công bố trên GenBank chỉ ra tỷ lệ tương đồng cao với loài *Telosma cordata*. Trong đó, trình tự vùng gen *matK* của mẫu nghiên cứu có độ tương đồng cao nhất đạt 99.42% so với trình tự của loài *Telosma cordata* plastid, partial genome (**KF539853.1**) trên ngân hàng gen quốc tế. Kết quả đã khẳng định đối tượng nghiên cứu thuộc loài *Telosma cordata* (Burm. f.) Merrill thuộc họ La bố ma (Apocynaceae).

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
Download Select columns Show 100								
select all 100 sequences selected								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Telosma cordata plastid, partial genome</a>	<a href="#">Telosma cordata</a>	1568	1568	99%	0.0	99.42%	129028	<a href="#">KF539853.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Telosma cordata maturase (matK) gene, partial cds</a>	<a href="#">Telosma cordata</a>	1568	1568	99%	0.0	99.42%	1538	<a href="#">DQ660551.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Gymnema sylvestri chloroplast, complete genome</a>	<a href="#">Gymnema sylv...</a>	1502	1502	99%	0.0	98.03%	161170	<a href="#">NC_047175.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Stephanotis volubilis voucher C.F. Zhang 5978 chloroplast, complete genome</a>	<a href="#">Stephanotis volu...</a>	1502	1502	99%	0.0	98.03%	161290	<a href="#">OP133576.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Gymnema latifolium voucher C.F. Zhang et al. 6195 chloroplast, complete genome</a>	<a href="#">Gymnema latifoli...</a>	1500	1500	99%	0.0	98.03%	161256	<a href="#">NC_079599.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Dregea sinensis var. corrugata voucher J.X. Yang et al. wbgd125 chloroplast, complete genome</a>	<a href="#">Dregea sinensis...</a>	1496	1496	99%	0.0	97.91%	161698	<a href="#">OP133575.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Gymnema yunnanense voucher C.F. Zhang 5993 chloroplast, complete genome</a>	<a href="#">Gymnema yunn...</a>	1496	1496	99%	0.0	97.91%	161436	<a href="#">NC_079598.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Jasminanthes maingayi chloroplast, complete genome</a>	<a href="#">Jasminanthes m...</a>	1496	1496	99%	0.0	97.91%	161660	<a href="#">MW719056.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Dregea sinensis chloroplast mRNA for maturase</a>	<a href="#">Dregea sinensis</a>	1493	1493	99%	0.0	97.80%	1548	<a href="#">Z98188.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lygisma inflexum voucher X.T. Ma 20210805006 chloroplast, complete genome</a>	<a href="#">Lygisma inflexum</a>	1491	1491	99%	0.0	97.80%	157158	<a href="#">NC_079596.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Ruehssia megalantha isolate NE692 maturase K (matK) gene, partial cds, chloroplast</a>	<a href="#">Ruehssia megal...</a>	1487	1487	98%	0.0	97.90%	900	<a href="#">MT370576.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Marsdenia tenacissima chloroplast, complete genome</a>	<a href="#">Gongronemopsi...</a>	1485	1485	99%	0.0	97.68%	164482	<a href="#">MW861760.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Stephanotis volubilis maturase K gene, partial cds, chloroplast</a>	<a href="#">Stephanotis volu...</a>	1482	1482	98%	0.0	97.89%	867	<a href="#">MK309377.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Ruehssia heringeri isolate NE315 maturase K (matK) gene, partial cds, chloroplast</a>	<a href="#">Ruehssia heringeri</a>	1480	1480	98%	0.0	97.89%	880	<a href="#">MT370575.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Marsdenia tinctoria voucher X.T. Ma 20210805004 chloroplast, complete genome</a>	<a href="#">Marsdenia tinctoria</a>	1480	1480	99%	0.0	97.56%	178308	<a href="#">NC_079597.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Ruehssia altissima isolate NE875 maturase K (matK) gene, partial cds, chloroplast</a>	<a href="#">Ruehssia altissima</a>	1480	1480	97%	0.0	98.11%	878	<a href="#">MT370577.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Marsdenia astephanoides plastid, partial genome</a>	<a href="#">Ruehssia asteph...</a>	1474	1474	99%	0.0	97.45%	123061	<a href="#">KF539849.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Sarcocobus globosus subsp. peregrinus chloroplast, complete genome</a>	<a href="#">Sarcocobus glob...</a>	1463	1463	99%	0.0	97.22%	161561	<a href="#">MW525446.1</a>

**Hình 3. 4.** Kết quả phân tích sự tương đồng của vùng *matK* của mẫu nghiên cứu với một số trình tự trên GenBank

Sau khi so sánh trình tự nucleotide của vùng *matK* của mẫu hoa với các trình tự trên GenBank, chúng tôi tiến hành xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm BioEdit và MegaX. Mô hình tối ưu được xác định là Phylogeny/ Construct/test Neighbor-Joining tree, phân tích bootstrap với 1000 lần lấy lại mẫu (Hình 3.5). Lịch sử tiến hóa được suy luận bằng cách sử dụng phương pháp Phylogeny/ Construct/test Neighbor-Joining tree cho thấy mẫu nghiên cứu có mối quan hệ gần gũi với loài *Telosma cordata* plastid với chỉ số bootstrap cao lên tới 99%, độ tin cậy cao. Từ kết quả cây phát sinh chủng loại chứng minh rằng mẫu thu hái thuộc loài *Telosma cordata*.



**Hình 3.5.** Biểu đồ hình cây về mối quan hệ phát sinh loài dựa trên trình tự nucleotide vùng gen *matK* của mẫu cây Thiên lý trong nghiên cứu

Kết quả Hình 3.6 cho thấy, khi so sánh trình tự vùng gen *psbA-trnH* của mẫu nghiên cứu với các trình tự được công bố trên GenBank chỉ ra tỷ lệ tương đồng cao với loài *Telosma cordata*. Trong đó, trình tự vùng gen *psbA-trnH* của mẫu nghiên cứu có độ tương đồng cao nhất đạt 97.62% so với trình tự của loài *Telosma cordata* plastid, partial genome (**KF539853.1**) trên ngân hàng gen quốc tế. Kết quả đã khẳng định đối tượng nghiên cứu thuộc loài *Telosma cordata* (Burm. f.) Merrill thuộc họ La bố ma (Apocynaceae).

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
<b>Sequences producing significant alignments</b>								
Download Select columns Show 100								
select all 100 sequences selected								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Telosma cordata plastid, partial genome</a>	<a href="#">Telosma cordata</a>	795	795	94%	0.0	97.62%	129028	<a href="#">KF539853.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Telosma accedens voucher UBT-Schneid 96-101 photosystem II protein D1 (psbA) gene, partial cds; psbA-trn...</a>	<a href="#">Telosma accedens</a>	566	566	88%	1e-156	90.11%	671	<a href="#">MW226392.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Gymnema graniticola voucher BRI-Mitchell 4142 photosystem II protein D1 (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH...</a>	<a href="#">Gymnema granit...</a>	444	444	99%	6e-120	83.11%	628	<a href="#">MW226369.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Telosma pallida voucher PMNH&lt;PAK&gt; Rizwana 37988-89 photosystem II protein D1 (psbA) gene, partial cds; ...</a>	<a href="#">Telosma pallida</a>	383	383	71%	1e-101	86.59%	553	<a href="#">MW226393.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Dregea sinensis var. corrugata voucher J.X. Yang et al. wbgd125 chloroplast, complete genome</a>	<a href="#">Dregea sinensis...</a>	364	469	99%	5e-96	80.74%	161698	<a href="#">OP133575.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Harmandiella cordifolia voucher QBG-La Ongssi 1689 photosystem II protein D1 (psbA) gene, partial cds; psb...</a>	<a href="#">Harmandiella co...</a>	339	339	93%	3e-88	80.62%	670	<a href="#">MW226334.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Gymnema geminatum voucher L.Forster PIF 28190 photosystem II protein D1 (psbA) gene, partial cds; psbA-t...</a>	<a href="#">Gymnema gemi...</a>	335	335	99%	4e-87	80.04%	608	<a href="#">MW226322.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Gymnema sylvestre voucher UBT-Meva 919 photosystem II protein D1 (psbA) gene, partial cds; psbA-trnH inte...</a>	<a href="#">Gymnema sylve...</a>	326	425	98%	2e-84	80.04%	570	<a href="#">MW226329.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Stephanotis arabica voucher F.Miller &amp; Talib 19077 photosystem II protein D1 (psbA) gene, partial cds; psbA-tr...</a>	<a href="#">Stephanotis ara...</a>	318	318	97%	4e-82	79.84%	597	<a href="#">MW226313.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Lygisma inflexum voucher X.T. Ma 20210805006 chloroplast, complete genome</a>	<a href="#">Lygisma inflexum</a>	318	423	100%	4e-82	79.32%	157158	<a href="#">NC_079596.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Marsdenia ecuadorensis plastid; chloroplast DNA containing partial trnH gene, trnH-psbA IGS and partial psbA...</a>	<a href="#">Marsdenia ecua...</a>	316	415	99%	1e-81	79.68%	581	<a href="#">LR794793.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Amalocalyx microlobus chloroplast DNA containing psbA-trnH IGS, specimen voucher HITBG.Liana Mensong...</a>	<a href="#">Amalocalyx micr...</a>	315	414	97%	5e-81	79.13%	593	<a href="#">HG005037.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Stephanotis volubilis voucher PS0842MT01 psbA-trnH intergenic spacer region, partial sequence, chloroplast</a>	<a href="#">Stephanotis volu...</a>	309	415	97%	2e-79	79.49%	508	<a href="#">GQ435176.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Stephanotis volubilis voucher C.F. Zhang 5978 chloroplast, complete genome</a>	<a href="#">Stephanotis volu...</a>	309	415	97%	2e-79	79.49%	161290	<a href="#">OP133576.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Jasminanthes maingayi chloroplast, complete genome</a>	<a href="#">Jasminanthes m...</a>	303	303	93%	1e-77	79.54%	161660	<a href="#">MW719056.1</a>

**Hình 3. 6.** Kết quả phân tích sự tương đồng của vùng *psbA-trnH* của mẫu nghiên cứu với một số trình tự trên GenBank

Kết quả Hình 3.7 cho thấy, khi so sánh trình tự vùng gen *rbcL* của mẫu nghiên cứu với các trình tự được công bố trên GenBank chỉ ra tỷ lệ tương đồng cao với loài *Telosma cordata*. Trong đó, trình tự vùng gen *rbcL* của mẫu nghiên cứu có độ tương đồng cao nhất đạt 99.46% so với trình tự của loài *Telosma cordata* plastid, partial genome (**KF539853.1**) trên ngân hàng gen quốc tế. Kết quả đã khẳng định đối tượng nghiên cứu thuộc loài *Telosma cordata* (Burm. f.) Merrill thuộc họ La bố ma (Apocynaceae).

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
<b>Sequences producing significant alignments</b>								
Download Select columns Show 100								
select all 100 sequences selected								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Telosma cordata plastid, partial genome</a>	<a href="#">Telosma cordata</a>	1016	1016	100%	0.0	99.46%	129028	<a href="#">KF539853.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Gymnema yunnanense voucher C.F. Zhang 5993 chloroplast, complete genome</a>	<a href="#">Gymnema yunn...</a>	1011	1011	100%	0.0	99.28%	161436	<a href="#">NC_079598.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Amalocalyx microlobus isolate 145_5_48 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbc...</a>	<a href="#">Amalocalyx micr...</a>	1011	1011	100%	0.0	99.28%	567	<a href="#">KF181484.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Marsdenia astephanoides plastid, partial genome</a>	<a href="#">Ruehssia asteph...</a>	1011	1011	100%	0.0	99.28%	123061	<a href="#">KF539849.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Ruehssia altissima isolate NE875 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene...</a>	<a href="#">Ruehssia altissi...</a>	1011	1011	100%	0.0	99.28%	715	<a href="#">MT304088.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Sarcobosus globosus subsp. peregrinus chloroplast, complete genome</a>	<a href="#">Sarcobosus glob...</a>	1011	1011	100%	0.0	99.28%	161561	<a href="#">MW525446.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Ruehssia megalantha isolate NE692 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) ge...</a>	<a href="#">Ruehssia megal...</a>	1011	1011	100%	0.0	99.28%	714	<a href="#">MT304084.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Gymnema latifolium voucher C.F. Zhang et al. 6195 chloroplast, complete genome</a>	<a href="#">Gymnema latifoli...</a>	1011	1011	100%	0.0	99.28%	161256	<a href="#">NC_079599.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Dregea volubilis voucher PS0842MT01 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL)...</a>	<a href="#">Stephanotis volu...</a>	1011	1011	100%	0.0	99.28%	703	<a href="#">GQ436514.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Gymnema sylvestre chloroplast, complete genome</a>	<a href="#">Gymnema sylve...</a>	1011	1011	100%	0.0	99.28%	161170	<a href="#">NC_047175.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Stephanotis volubilis ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, partial cds; chloro...</a>	<a href="#">Stephanotis volu...</a>	1011	1011	100%	0.0	99.28%	577	<a href="#">MK309396.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Gymnema sylvestre ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, complete cds; chl...</a>	<a href="#">Gymnema sylve...</a>	1011	1011	100%	0.0	99.28%	1458	<a href="#">MT856050.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Stephanotis volubilis voucher C.F. Zhang 5978 chloroplast, complete genome</a>	<a href="#">Stephanotis volu...</a>	1011	1011	100%	0.0	99.28%	161290	<a href="#">OP133576.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Jasminanthes maingayi chloroplast, complete genome</a>	<a href="#">Jasminanthes m...</a>	1005	1005	100%	0.0	99.10%	161660	<a href="#">MW719056.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Stephanotis floribunda chloroplast partial rbcL gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase larg...</a>	<a href="#">Marsdenia florib...</a>	1005	1005	99%	0.0	99.10%	1445	<a href="#">AJ419762.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Jasminanthes mucronata P3186 chloroplast rbcL gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase I...</a>	<a href="#">Jasminanthes m...</a>	1003	1003	99%	0.0	99.28%	553	<a href="#">LC625490.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Cynanchum racemosum voucher BioBot00914 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subuni...</a>	<a href="#">Cynanchum rac...</a>	1002	1002	99%	0.0	99.28%	552	<a href="#">JQ590527.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Gymnema sylvestre voucher Chase_3902_(K) ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subuni...</a>	<a href="#">Gymnema sylve...</a>	1002	1002	99%	0.0	99.28%	1383	<a href="#">JQ933350.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Dregea abyssinica voucher Goyder et al. 3918_(K) ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large s...</a>	<a href="#">Stephanotis aby...</a>	1002	1002	99%	0.0	99.28%	1383	<a href="#">JQ933311.1</a>

**Hình 3. 7.** Kết quả phân tích sự tương đồng của vùng *rbcL* của mẫu nghiên cứu với một số trình tự trên GenBank

Như vậy, kết quả cho thấy trình tự 3 chỉ thị *matK*, *RbcL* và *psbA-trnH* thu được tương đồng cao từ 97.63% đến 99.46% so với trình tự các chỉ thị được công bố trên ngân hàng gen tương ứng với mẫu cây nghiên cứu. Kết quả chi tiết thể hiện trong Bảng 3.2. Đây là cơ sở tin cậy để khẳng định mẫu cây Thiên lý thu được đúng tên khoa học của loài cần thu hái. Những kết quả này kết luận rằng mẫu hoa thu thập được là thuộc chi *Telosma*, cụ thể là loài Thiên lý (*Telosma cordata*).

**Bảng 3.2.** Kết quả so sánh trình tự các chỉ thị định danh trên mẫu cây nghiên cứu

STT	Tên mẫu	Tên mẫu trên ngân hàng gene NCBI	Mức độ tương đồng các gene		
			<i>matK</i>	<i>RbcL</i>	<i>trnH-psbA</i>
1	Cây Thiên lý	<i>Telosma cordata</i> (Burm. f.)	99.42%	99.46%	97.63%

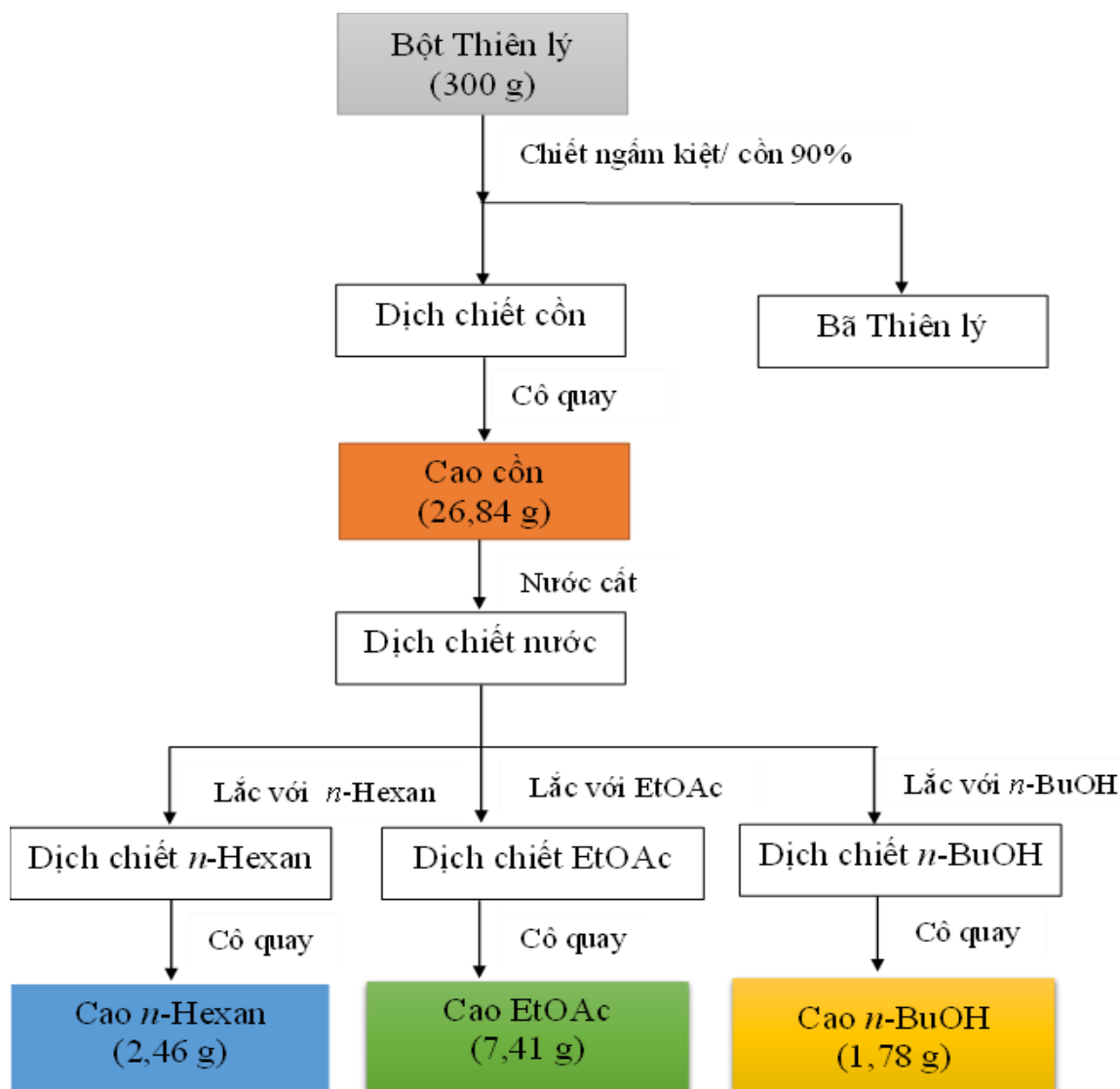
Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày một phương pháp định danh thực vật có độ chính xác cao dựa trên phân tích trình tự DNA. Mã vạch DNA chứng minh tiềm năng là một phương pháp thực tế và chuẩn hóa để định danh đối tượng nghiên cứu ở cấp độ loài của cả loài nấm và loài thực vật. Hiệu quả của nó phụ thuộc rất nhiều vào việc thiết lập cơ sở dữ liệu trình tự chất lượng cao [65, 66]. Như một phần của quy trình định danh bằng mã vạch DNA, các nghiên cứu trước đây đã sử dụng ba vùng mã vạch DNA khác nhau: *mat K*, *rbcL* và *trnH-psbA* để xác định thành công nhiều loài [67]. Vùng gen *trnH-psbA* cho thấy tính hữu ích trong việc phân loại hệ thực vật có quan hệ họ hàng gần gũi. Việc vùng này có các cơ sở dữ liệu công khai còn hạn chế, đóng vai trò quan trọng trong các phân tích định danh trên nhiều nhóm sinh vật được ghi nhận [68]. Hơn nữa, gen *mat K* đã chứng minh sự khuếch đại và sắp xếp liền mạch ở các loài đang nghiên cứu, cho thấy khả năng định danh mạnh mẽ giữa các nhóm khác nhau (Hình 3.5). Saha và cộng sự [69] đã công nhận gen *matK* là mã vạch DNA phổ quát cho thực vật có hoa. Trong thời gian gần đây, các nghiên cứu đã ủng hộ tính phổ quát của nó và đề xuất kết hợp *matK* với *rbcL* làm mã vạch DNA phổ quát cho thực vật. Ngoài ra, cả hai vùng *rbcL* và *trnH-psbA* đều cho thấy khả năng khuếch đại và giải trình tự dễ dàng, xác nhận tính phù hợp của chúng cho các ứng dụng khoa học trong các nghiên cứu về nhận dạng và đa dạng thực vật [70].

### 3.2. Kết quả tạo các dịch chiết từ mẫu hoa Thiên lý và khảo sát thành phần hóa học bằng sắc ký lớp mỏng

#### 3.2.1. Tạo các cao chiết từ mẫu hoa Thiên lý



Quy trình điều chế các cao phân đoạn mẫu hoa Thiên lý được thể hiện ở Hình 3.8. Mẫu cây Thiên lý được nghiền và ngâm chiết trong ethanol 90%. Trước khi ngâm chiết, khối lượng mẫu khô được cân để tính tỷ lệ cao chiết thu được từ mẫu sau khi cô quay chân không loại bỏ dung môi hoàn toàn đến khối lượng không đổi. Kết quả khối lượng cao thu được và hiệu suất chiết được thể hiện trong Bảng 3.3.



**Hình 3. 8.** Sơ đồ chiết xuất phân đoạn mẫu hoa Thiên lý

**Bảng 3. 3.** Khối lượng và tỷ lệ cao chiết từ các mẫu cây Thiên lý

STT	Tên mẫu	Dung môi	Khối lượng (g)	Cao chiết (g)	Tỷ lệ (%)
1	Cây thiên lý	EtOH	300	26,84	8,95
2		Hex	300	2,46	0,82
3		EtOAc	300	7,41	2,47
4		BuOH	300	1,78	0,59

Kết quả cho thấy từ 300 g khối lượng khô mẫu hoa, chúng tôi thu được khối lượng cao chiết tổng ở mẫu cây Thiên lý có khối lượng 26,84 (g) chiếm tỷ lệ là 8,95%. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chọn ethanol làm dung môi ngâm chiết nhằm mục đích thu được nhiều nhất khối lượng cao chiết và đây là dung môi thân thiện với môi trường, ít gây độc cho con người. Cao chiết tổng tiếp tục được chiết phân lớp lỏng-lỏng với các dung môi có độ phân cực khác nhau, nhằm mục đích tách các chất có độ phân cực khác nhau thành các cao chiết phân lớp. Kết quả cho thấy, từ cao chiết tổng, cao chiết EtOAc mẫu hoa Thiên lý chiếm tỷ lệ cao nhất đạt 2,47%. Tiếp theo, đến cao chiết hexan và cuối cùng là cao chiết butanol với tỷ lệ lần lượt đạt 0,82% và 0,59%. Như vậy, phương pháp chiết lỏng-lỏng là phương pháp chiết đơn giản, dễ thực hiện, ít cần trang thiết bị hiện đại và đem lại hiệu quả cao. Các cao chiết này được bảo quản ở 4 °C sử dụng cho các nghiên cứu chuyên sâu tiếp theo.

### 3.2.2. *Khảo sát thành phần hóa học bằng sắc ký lớp mỏng*

Thành phần sơ bộ của các cao chiết từ hoa Thiên lý được định tính bằng sắc ký lớp mỏng (TLC). Tiến hành sắc ký lớp mỏng các cao chiết tổng và phân lớp được khảo sát với 10 hệ dung môi khác nhau để định tính sơ bộ thành phần hóa học trong các dịch chiết mẫu hoa Thiên lý:

D1 = n-Hexan – EtOAc (9:1)

D2 = n-Hexan – Aceton (9:1)

D3 = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – Aceton (95:5)

D4 = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – MeOH – Acid acetic (7:3: 1 giọt)

D5 = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – MeOH – Acid acetic (6:4: 1 giọt)

D6 = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – MeOH – Acid acetic (5:5: 1 giọt)

D7 = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – MeOH (9:1)

D8 = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – MeOH (8:2)

D9 = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – MeOH – Acid acetic (7:3: 1 giọt)

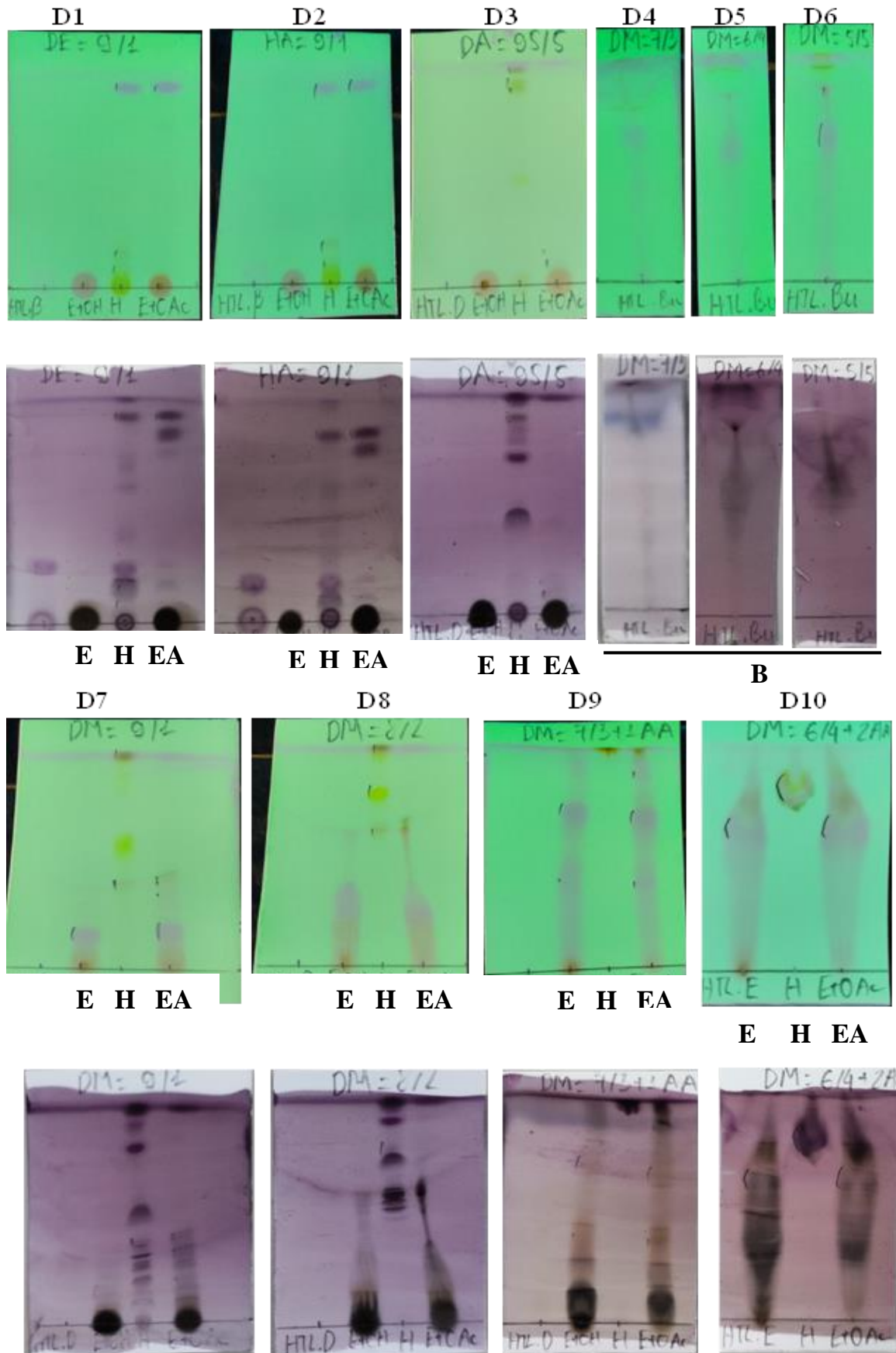
D10 = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – MeOH – Acid acetic (6:4: 2 giọt)

Các chất trong cao chiết tổng và phân lớp được phát hiện dưới UV 254 nm và phun Vanilin sấy ở 105 °C đến khi hiện màu, quan sát dưới ánh sáng thường. Kết quả thể hiện trong hình 3.10. Kết quả cho thấy hệ dung môi dung môi D7 = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – MeOH (9:1) cho kết quả tách tốt nhất với các cao chiết từ hoa Thiên lý. Kết quả cũng thể hiện



cao chiết tổng và cao chiết phân lớp có sự khác biệt lớn về thành phần hoá học dựa trên độ phân cực của các chất.

Để xác minh sự hiện diện của các hợp chất trong dịch chiết hoa Thiên lý bằng phân tích TLC, mười pha động đã được chọn để phân tích các dịch chiết: Dichloromethane (DCM): Metanol (MeOH) (9:1, v/v); DCM: MeOH (8:2, v/v), Dichloromethane (DCM): Metanol (MeOH)- Acid acetic (7:3: 1 giọt) cho chiết xuất butanol phân cực hơn; Hexan – Aceton (9:1, v/v); DCM: Aceton (95:5, v/v); Hexan: EtOAc (9:1, v/v) dùng để định tính cao chiết hexan, etyl acetat và ethanol. Chúng tôi sử dụng thuốc thử Vanillin để đánh giá sự hiện diện của các hợp chất polyphenol, phytosterol và terpenoid trong dịch chiết. Như được hiển thị trong Hình 3.9, chúng tôi đã kiểm tra trên tấm TLC được tạo dưới ánh sáng tia cực tím có bước sóng 254nm trước khi tiến hành tạo dẫn xuất. Khi tấm này tiếp xúc với tia UV có bước sóng 254nm, chúng tôi quan sát thấy các hợp chất thơm và hệ liên hợp cao đề cập đến các vùng tối trên nền huỳnh quang màu xanh lục nhạt của tấm TLC. Chúng tôi đã sử dụng thuốc thử Vanillin để tạo dẫn xuất nhằm xác định nhiều loại sản phẩm tự nhiên trong dịch chiết. Sau khi xử lý Vanillin, tấm TLC biểu hiện sự phát xạ màu tím, xanh lam, đỏ hoặc xanh lục, đề cập đến sự tồn tại của terpen, phenol, steroid và đường trong chiết xuất của hoa Thiên lý. Dựa vào màu sắc khác nhau của các dải trên tấm TLC sau khi tạo dẫn xuất bằng Vanillin, chúng ta có thể dự đoán các hợp chất có trong mẫu chiết. Trong pha động (Hexan: Aceton (9:1, v/v), dải màu tím dưới ánh sáng khả kiến ở bước sóng 254 nm khi phun Vanillin và không hiện vệt trước khi phun thuốc thử khi soi dưới ánh sáng UV 254 nm gợi ý sự có mặt của sterol, terpenoid trong dịch chiết ở  $R_f = 0,75$ , trong khi dải màu hồng thể hiện sự tồn tại của flavonoid trong dịch chiết hoa Thiên lý ở  $R_f = 0,9$  ở hệ dung môi D3 (Hình 3.9). Do đó, dịch chiết hoa Thiên lý có chứa các hợp chất như sterol, terpenoid, flavonoid, polyphenolic.



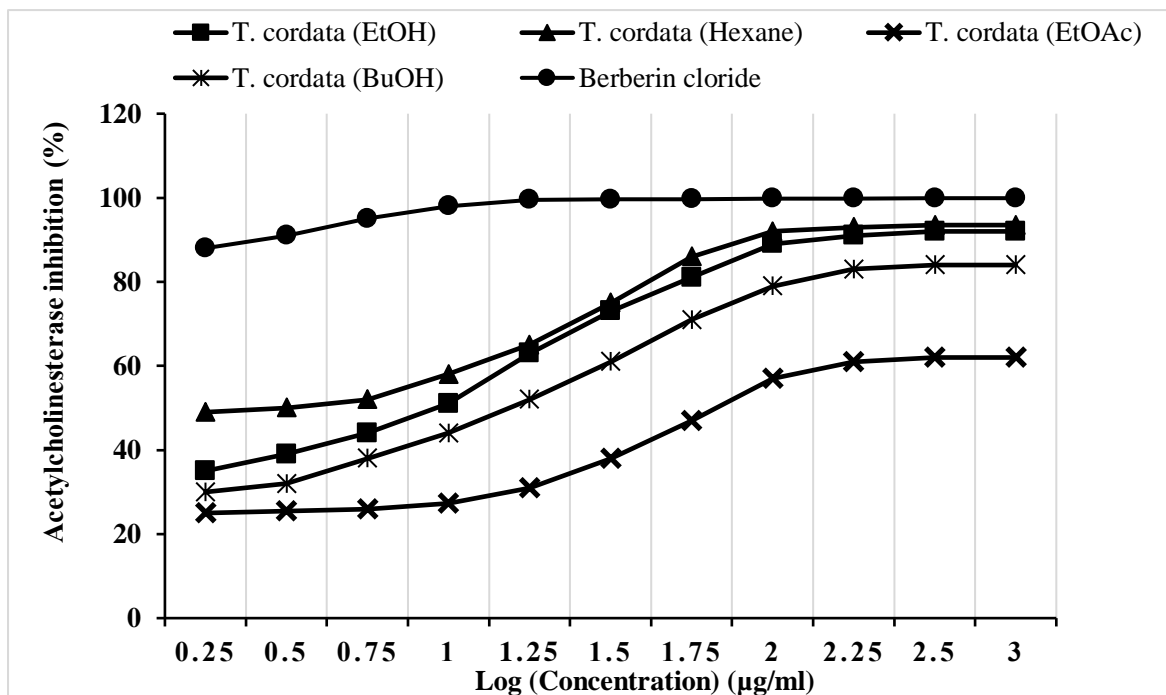
**Hình 3. 9.** Kết quả sắc ký lớp mỏng mẫu cao chiết từ mẫu cây Thiên lý nghiên cứu. Cao chiết Ethanol (**E**), cao chiết Hexan (**H**), cao chiết ethyl acetate (**EA**), cao chiết butanol (**B**).

Sắc ký lớp mỏng (TLC) là một kỹ thuật tách các chất bằng cách dẫn dịch chiết mẫu qua pha tĩnh tấm TLC sử dụng các hệ dung môi động khác nhau dựa vào độ phân cực của chúng. Sự phân tách này phụ thuộc vào ái lực khác nhau của từng thành phần đối với cả pha động và pha tĩnh [71]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi mô tả phương pháp TLC cho phép phát hiện các hợp chất trong chiết xuất từ mẫu cây sử dụng Vanillin làm thuốc thử tạo dẫn xuất. TLC đã liên tục chứng minh tính ưu việt của nó như là phương pháp được lựa chọn nhờ tính linh hoạt, sự phù hợp, tiện lợi và khả năng phân tích nhanh hơn khi so sánh với các kỹ thuật thay thế [72]. Việc tiến hành phân tích TLC của các chất chiết xuất mang lại những bằng chứng thuyết phục về sự hiện diện của nhiều chất thực vật. Các hợp chất thực vật khác nhau thể hiện các giá trị  $R_f$  khác nhau trong các hệ dung môi khác nhau. Sự đa dạng về giá trị  $R_f$  của các hợp chất thực vật mang lại những hiểu biết có giá trị về tính phân cực của chúng và hỗ trợ trong việc lựa chọn hệ dung môi tối ưu để tinh chế các hợp chất tinh khiết thông qua sắc ký cột [73].

### 3.3. Sàng lọc hoạt tính ức chế enzyme AChE của mẫu dịch chiết từ hoa Thiên lý

Để sàng lọc các chất ức chế enzyme AChE, chúng tôi đã tiến hành sàng lọc bằng phương pháp Ellman *in vitro*, với Berberine clorua làm đối chứng dương. Kết quả thể hiện trong Hình 3.10 và Bảng 3.4. Kết quả cho thấy cao chiết từ hoa Thiên lý cho hoạt tính ức chế enzym AChE và phụ thuộc vào nồng độ xử lý. Trong đó, cao chiết phân lớp hexane từ cây Thiên lý thể hiện khả năng ức chế AChE mạnh nhất, giá trị  $IC_{50}$  được ghi nhận là  $6,196 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$ . Các cao chiết khác từ cây Thiên lý cũng cho hoạt tính ức chế AChE ở các mức độ khác nhau, với giá trị  $IC_{50}$  của các cao chiết Thiên lý EtOH, BuOH, và EtOAc lần lượt là  $6,196 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$ ,  $8,352 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$ ,  $13,474 \pm 0,48 \mu\text{g/ml}$  và  $67,546 \pm 3,78 \mu\text{g/ml}$  (Bảng 3.3). Với kết quả này, nhóm nghiên cứu quyết định lựa chọn dịch chiết *n*-hexan mẫu hoa Thiên lý cho các nghiên cứu chuyên sâu hơn về cơ chế kéo dài sợi trục neuron và đánh giá mức độ biểu hiện gen, protein của các gen liên quan đến thần kinh trên tế bào thần kinh C6.

Enzyme acetylcholinesterase (AChE) tồn tại ở hai dạng khác nhau trong não, được gọi là monome (G1) và tetrame (G4), chịu trách nhiệm thủy phân acetylcholine trong hệ thần kinh. Isoform G4, chiếm phần lớn tổng số AChE, có liên quan chặt chẽ đến chức năng nhận thức [74-76]. Trong con đường chống viêm cholinergic (CAP), AChE đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh tương tác giữa ACh và  $\alpha 7\text{nAChR}$  [77, 78], điều chỉnh phản ứng miễn dịch trong não. Các chất ức chế AChE đã được xây dựng và phát triển như các tác nhân điều trị tiềm năng để kiểm soát chứng mất trí.



**Hình 3. 10.** Phần trăm ức chế enzyme acetylcholinesterase bởi các phân đoạn khác nhau của mẫu hoa Thiên lý và Berberin chloride

**Bảng 3. 4.** Kết quả giá trị  $IC_{50}$  ức chế enzyme AChE của các mẫu nghiên cứu

STT	Mẫu nghiên cứu	$IC_{50}$ (µg/ml)
1	Hoa Thiên lý (EtOH)	$8,352 \pm 0,12$
2	Hoa Thiên lý (Hex)	$6,196 \pm 0,02$
3	Hoa Thiên lý (EtOAc)	$67,546 \pm 3,78$
4	Hoa Thiên lý (BuOH)	$13,474 \pm 0,48$
5	Berberin chloride (PC)	$0,289 \pm 0,03$

$IC_{50}$  (µg/ml) là nồng độ mà tại đó ức chế 50% hoạt tính AChE, được biểu thị dưới dạng Trung bình  $\pm$  SD của 3 thí nghiệm độc lập

PC: Đối chứng dương.

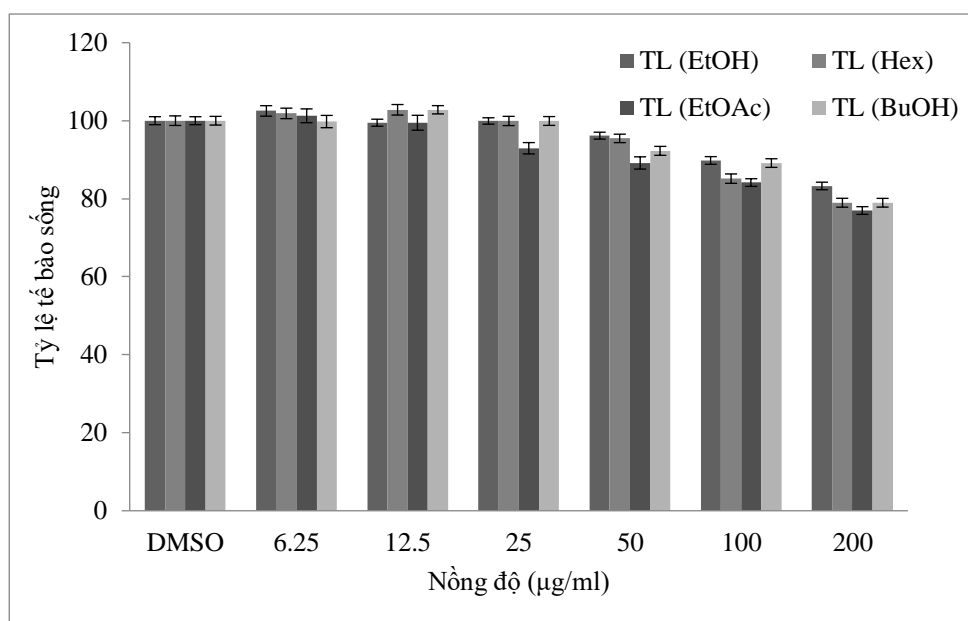
Trong nghiên cứu trước đây, một chiết xuất từ cây thuốc khác, Pei Li và cộng sự chỉ ra rằng toàn bộ chiết xuất thảo dược của *Dichocarpum auriculatum* cũng thực hiện hoạt động ức chế AChE theo phương pháp Ellman [79]. Trong khi chiết xuất hoa Thiên lý của chúng tôi được đánh giá về hoạt động ức chế AChE, chúng tôi thấy rằng chiết xuất hexane của Thiên lý cho thấy khả năng ức chế cao hơn ( $IC_{50} = 6,196 \pm 0,02$  µg/ml) so

với kết quả trước đó đối với chiết xuất *D. auriculatum* ( $IC_{50} = 150 \mu\text{g/ml}$ ) [79]. Kết quả này thể hiện hoạt động ức chế AChE và thấp hơn so với đối chứng dương - Berberine chloride ( $IC_{50} = 0,289 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$ ). Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng của cao chiết hexan trong việc ức chế hoạt tính enzyme AChE, cao chiết này rất đáng quan tâm và cần được nghiên cứu thêm để điều trị bệnh liên quan đến thần kinh.

### 3.4. Đánh giá khả năng gây độc của các dịch chiết tách từ hoa Thiên lý và sàng lọc hoạt tính kéo dài neuron lên tế bào thần kinh

#### 3.4.1. Đánh giá khả năng gây độc của các dịch chiết tách từ hoa Thiên lý lên tế bào thần kinh

Các mẫu cao chiết từ các mẫu cây Thiên lý được đánh giá hoạt tính gây độc trên dòng tế bào thần kinh C6. Kết quả cho thấy tỷ lệ tế bào C6 sống không có sự khác biệt giữa nhóm được xử lý với cao chiết từ mẫu cây Thiên lý so với nhóm đối chứng trong nồng độ nghiên cứu từ 6,25 đến 200  $\mu\text{g/ml}$ . Với các cao chiết từ hoa Thiên lý, tỷ lệ tế bào sống thấp nhất được khi nhận ở cao chiết ethyl acetate ở nồng độ 200  $\mu\text{g/ml}$  với tỷ lệ sống đạt 76,6%. Kết quả thể hiện ở nồng độ nghiên cứu từ 6,25 đến 200  $\mu\text{g/ml}$  các mẫu cao chiết từ cây hoa Thiên lý có hoạt tính gây độc tế bào thần kinh C6 không đáng kể. Do đó, dựa trên kết quả đánh giá khả năng gây độc tế bào, chúng tôi tiếp tục tiến hành thí nghiệm sàng lọc hoạt tính kéo dài sợi trục neuron của các dịch chiết hoa Thiên lý lên tế bào thần kinh C6.



**Hình 3.11.** Hoạt tính gây độc tế bào của các cao chiết từ hoa Thiên lý

#### 3.4.2. Hoạt tính kéo dài neuron của các dịch chiết tách từ hoa Thiên lý lên tế bào thần kinh

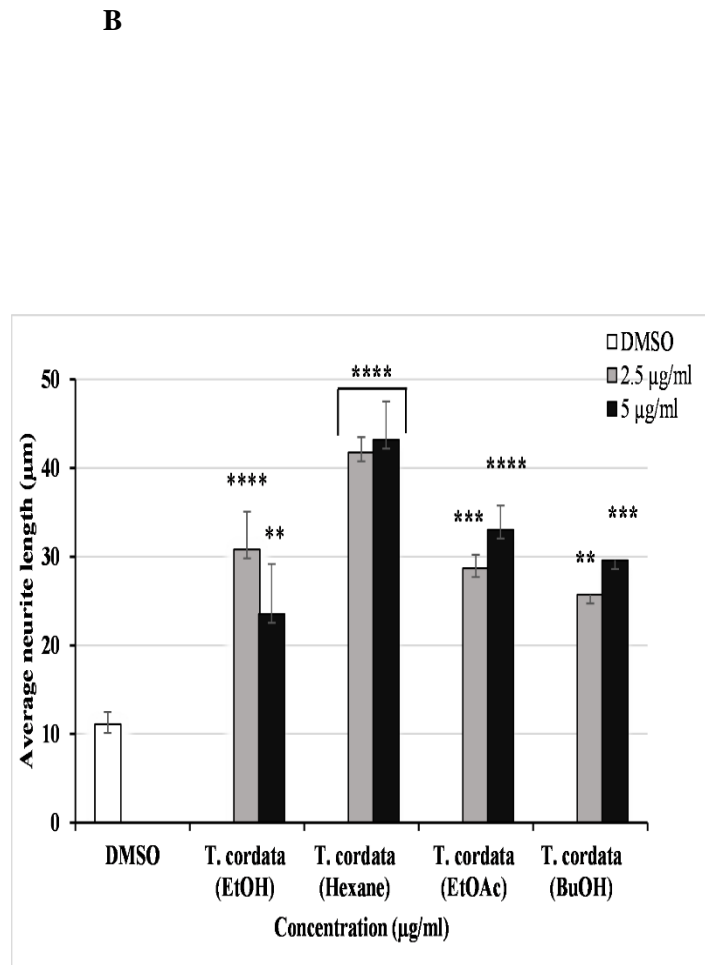
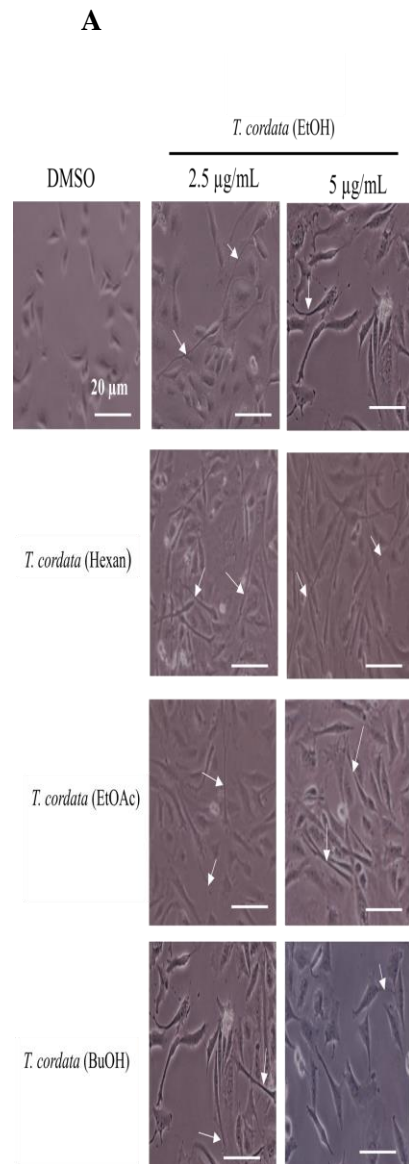
Để đánh giá ảnh hưởng của các cao chiết từ mẫu thực vật lên kéo dài sợi trục neuron, tế bào C6 được xử lý với 2 nồng độ (2,5  $\mu\text{g/ml}$  và 5  $\mu\text{g/ml}$ ), sau đó được quan sát dưới vật kính 20x. Dimethyl sulfoxide (DMSO) được sử dụng là đối chứng âm. Hình thái tế bào thần kinh được quan sát dưới kính hiển vi sau khi xử lý với các nồng độ mẫu khác nhau sau 24 giờ. Kết quả ở Hình 3.12 cho thấy các cao chiết từ mẫu hoa có hoạt tính làm tăng đáng kể chiều dài trung bình sợi trục neuron khi so sánh với đối chứng âm 0.1% DMSO. Trong đó cao chiết hexan từ hoa Thiên lý cho hoạt tính mạnh nhất. Ở nồng độ 2,5  $\mu\text{g/mL}$ , cao chiết hexan thể hiện hoạt động thúc đẩy sự phát triển sợi trục thần kinh cao nhất, trong khi cao chiết BuOH thể hiện hoạt động thúc đẩy sự phát triển sợi trục thần kinh thấp nhất, với chiều dài sợi trục thần kinh trung bình lần lượt là  $41,74 \pm 4,26 \mu\text{m}$  và  $25,71 \pm 1,49 \mu\text{m}$ . Tương tự như vậy, ở nồng độ 5  $\mu\text{g/mL}$ , cao chiết hexan vẫn có hoạt động thúc đẩy sự phát triển nhánh sợi trục cao nhất, trong khi chiết xuất EtOH cho thấy hoạt động thúc đẩy sự phát triển nhánh sợi trục thấp nhất, với chiều dài nhánh sợi trục trung bình lần lượt là  $43,18 \pm 5,62 \mu\text{m}$  và  $23,54 \pm 2,43 \mu\text{m}$  (Hình 3.12B). Cao chiết hexan từ hoa Thiên lý cũng cho thấy khả năng kéo dài sợi trục neuron phụ thuộc vào nồng độ trong hoạt tính kéo dài sợi trục neuron thúc đẩy sự phát triển của tế bào thần kinh C6. Do đó, chúng tôi chọn cao chiết hexan cho các thí nghiệm tiếp theo.

Sự phát triển vượt bậc của neuron quyết định sự phát triển bình thường của hệ thần kinh. Hơn nữa, nó đóng một vai trò quan trọng trong việc điều trị các bệnh thoái hóa thần kinh. Các báo cáo trước đây cho thấy vai trò của các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên trong việc tăng cường sự phát triển thần kinh. Hợp chất polyphenol được phân lập từ trà xanh, EGCG được chứng minh thúc đẩy sự phát triển thần kinh trong tế bào PC12 [80]. Ngoài ra, một hợp chất phenolic khác, Cyanidin-3-Glucoside được quan sát thấy thúc đẩy sự phát triển của tế bào Neuro 2a [81].

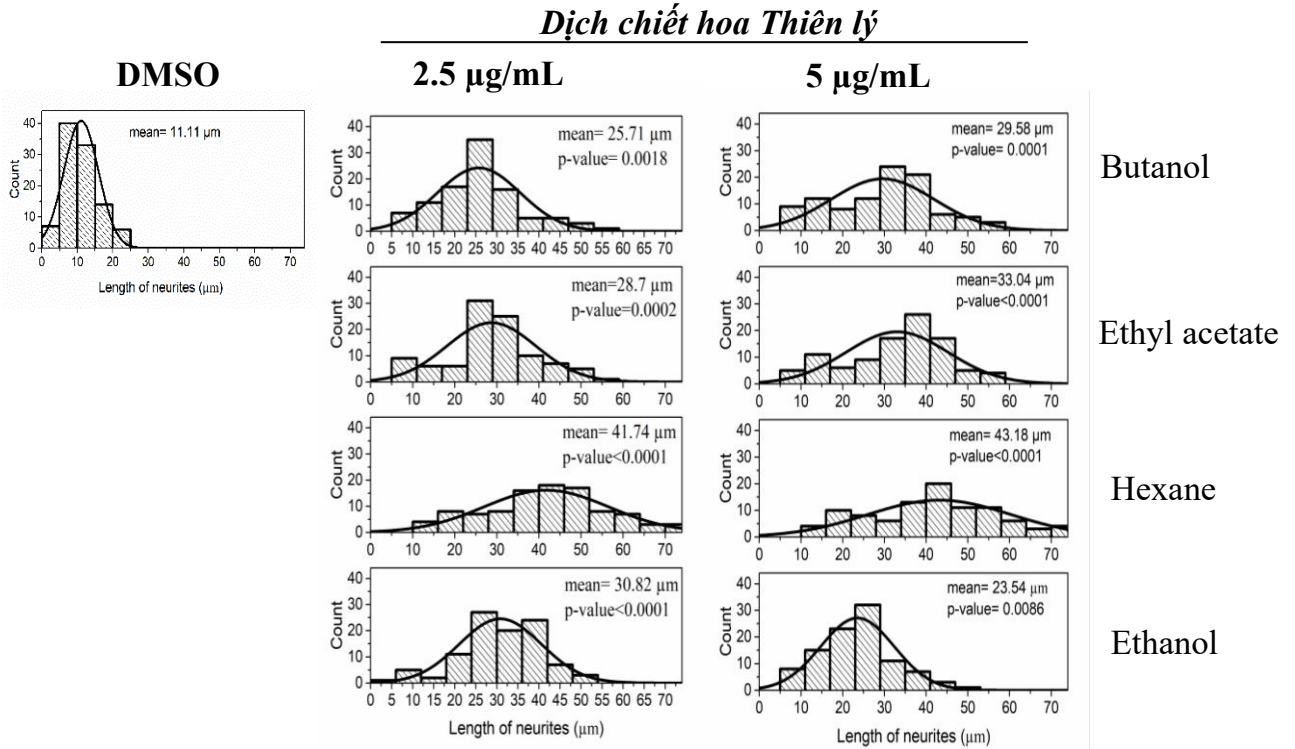
Đáng chú ý rằng các dịch chiết của hoa Thiên lý, đặc biệt là dịch chiết n-hexan và dịch chiết EtOAc cho thấy sự phát triển nhanh hơn đáng kể của neuron so với đối chứng âm (Hình 3.12A). Mặc dù các dịch chiết khác cũng kích thích sự phát triển neuron nhưng nó không đáng kể. Do đó, dịch chiết n-hexan 2,5  $\mu\text{g/ml}$  và dịch chiết EtOAc 5  $\mu\text{g/ml}$  là phân đoạn dịch chiết tiềm năng thúc đẩy sự phát triển nhanh của sợi trục neuron.

Như vậy, dựa trên kết quả đánh giá khả năng gây độc tế bào, sàng lọc hoạt tính kéo dài sợi trục neuron, kết hợp với hoạt tính ức chế enzyme AChE, chúng tôi đã chọn

cao chiết hexan từ hoa Thiên lý cho các thử nghiệm tiếp theo về biểu hiện gen và protein liên quan đến thần kinh.



C



**Hình 3. 12.** Hoạt tính kéo dài sợi trục neurite của cao chiết hexan từ hoa Thiên lý lên tế bào thần kinh C6. (A) Hình thái tế bào C6 sau khi điều trị với các dịch chiết hoa Thiên lý ở các nồng độ khác nhau và đối chứng âm 0,1% DMSO. Soi ở vật kính 20x. (B-C) Biểu đồ thể hiện chiều dài trung bình sợi trục neurite khi điều trị với nồng độ khác nhau của dịch chiết hoa Thiên lý so với đối chứng âm 0,1% DMSO. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  và \*\*\*\* $p < 0.0001$  (ANOVA). Dữ liệu được thể hiện dưới dạng Trung bình  $\pm$  SD, N=100.

Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên, chúng tôi đề xuất rằng chiết xuất từ hoa của Thiên lý gây ra sự phát triển nhánh thần kinh ở dòng tế bào C6 của chuột. Đặc biệt, chiều dài trung bình của nhánh thần kinh tăng gấp năm lần khi tế bào được xử lý bằng chiết xuất hexane của Thiên lý so với đối chứng âm DMSO 0,1%. Hiệu ứng này có thể giúp kết nối các tế bào ở rất xa nhau. Nhiều nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng sự phát triển nhánh thần kinh có thể được gây ra bởi các hợp chất tự nhiên riêng lẻ hoặc kết hợp với các yếu tố dinh dưỡng thần kinh [16, 17]. Việc chiết xuất của hoa Thiên lý (HTL) thúc đẩy sự kéo dài sợi trục neuron cho thấy rằng loài này chứa hợp chất có triển vọng có thể tạo ra tác động giống như yếu tố dinh dưỡng thần kinh (BDNF). Một cơ chế có thể có trong hoạt động thúc đẩy sự kéo dài sợi trục neuron của tế bào thần kinh là HTL



chứa nhiều loại hợp chất chống oxy hóa như flavonoid, phenolic và polyphenol có thể mang lại khả năng bảo vệ thần kinh bằng cách loại bỏ các gốc tự do hoặc kích hoạt hệ thống chống oxy hóa của tế bào [82]. Nghiên cứu của chúng tôi chứng minh rằng chiết xuất hexane của Thiên lý có hoạt tính thúc đẩy sự phát triển nhánh thần kinh mạnh mẽ ở tế bào thần kinh C6.

### **3.5. Đánh giá mức độ ảnh hưởng của dịch chiết mẫu hoa Thiên lý lên sự biểu hiện của các gen Brain-Derived Neurotrophic Factor (bdnf), Nerve Growth Factor (NGF), acetyl H3**

#### **3.5.1. Kết quả tách chiết RNA tổng số của dịch chiết n-hexan mẫu hoa Thiên lý**

Lão hóa là yếu tố nguy cơ chính gây ra bệnh suy giảm trí nhớ, đặc biệt là bệnh Alzheimer. Bệnh Alzheimer (AD) là bệnh sa sút trí tuệ phổ biến nhất và được đặc trưng bởi sự hình thành các mảng thần kinh bao gồm *amyloid  $\beta$*  và các đám rối sợi thần kinh bao gồm protein *tau* tăng phosphoryl hóa. Sự tích lũy *amyloid  $\beta$*  và/hoặc *tau* tăng phosphoryl hóa dẫn đến suy giảm độ dẻo của khớp thần kinh, viêm thần kinh và tế bào thần kinh chết theo chương trình. Nhiều bằng chứng cho thấy vai trò của các yếu tố thần kinh bao gồm BDNF, NGF và acetyl H3 đóng vai trò quan trọng trong bệnh lý AD. Mức biểu hiện gen và protein đã giảm ở vỏ não của những đối tượng bị suy giảm nhận thức nhẹ và bệnh nhân AD [83].

Để xác định xem chiết xuất hexane của hoa Thiên lý có ảnh hưởng đến sự biểu hiện của các yếu tố tế bào thần kinh hay không, chúng tôi đã đánh giá sự biểu hiện của các gen BDNF, NGF và acetyl H3 trong tế bào C6 sau khi xử lý với dịch chiết hexan mẫu hoa Thiên lý ở các nồng độ khác nhau 1  $\mu\text{g/ml}$ , 2,5  $\mu\text{g/ml}$  và 5  $\mu\text{g/ml}$  sau 24h.

Trước tiên, chúng tôi tiến hành tách chiết RNA tổng số của các mẫu bao gồm DMSO 0,1 %, HTL (Hexan) ở các nồng độ khác nhau 1  $\mu\text{g/ml}$ , 2,5  $\mu\text{g/ml}$  và 5  $\mu\text{g/ml}$  được điều trị trong tế bào thần kinh C6 sau 24h. Kết quả Bảng 3.5. cho thấy nồng độ mRNA trong các mẫu đều khá cao, với mẫu thấp nhất đạt 157,0 ng/ $\mu\text{l}$ , các mẫu đều có chỉ số A260/A280 trong khoảng 1,9. Đây là kết quả hợp lý vì sản phẩm chứa phần lớn là RNA. Với kết quả trên cho thấy RNA thu được đủ điều kiện để sử dụng cho Real-time PCR.

**Bảng 3. 5.** Kết quả đo nồng độ RNA mẫu Thiên lý bằng Nanodrop

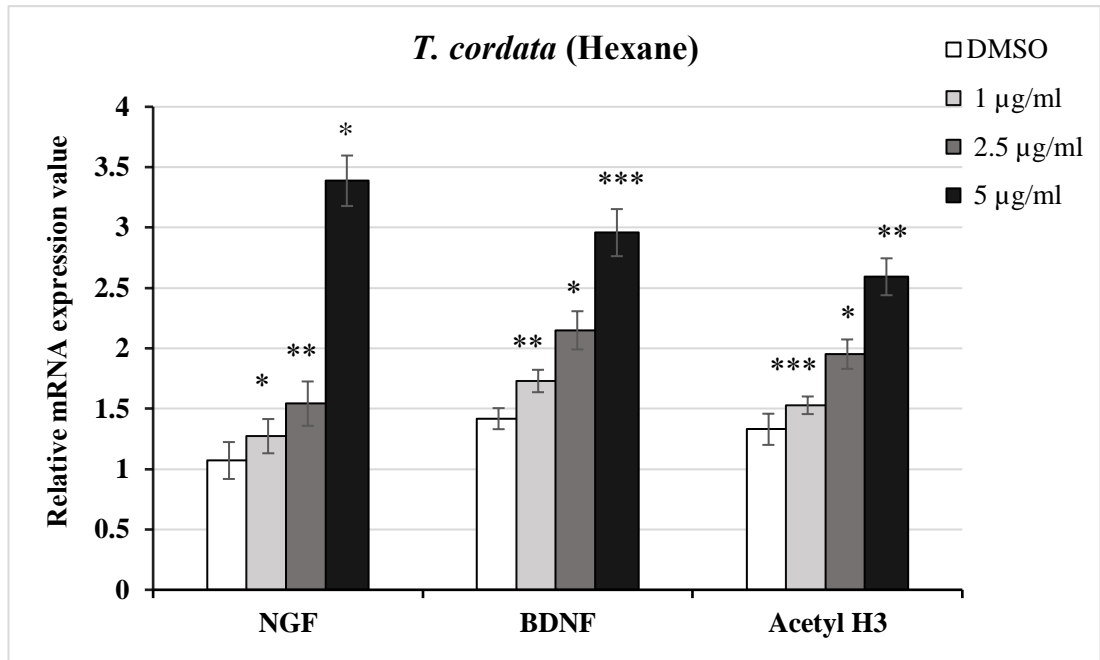
STT	Tên mẫu	Nồng độ (ng/ $\mu$ l)	A260/A280
1	DMSO	163,2	1,91
2	HTL (Hex) 1 $\mu$ g/ ml	163,4	1,94
3	HTL (Hex) 2,5 $\mu$ g/ ml	159,9	1,97
4	HTL (Hex) 5 $\mu$ g/ ml	157,0	1,90

❖ **Xác định gen tham chiếu**

Để có thể so sánh chính xác sự khác nhau trong biểu hiện của gen mục tiêu giữa các mẫu bằng phản ứng real-time PCR định lượng tương đối (relative qRT-PCR), việc chọn gen tham chiếu (reference gene) để chuẩn hóa (normalized) rất quan trọng. Yêu cầu của gen dùng để chuẩn hóa là gen phải luôn có sự biểu hiện ổn định cao giữa các mẫu so sánh. Theo nghiên cứu trước đây, gen *Gapdh* có sự biểu hiện ổn định nhất trong các thí nghiệm trên tế bào. Vì vậy, *Gapdh* được chúng tôi sử dụng làm gen chuẩn hóa trong nghiên cứu này.

**3.5.2. Ảnh hưởng của dịch chiết *n*-hexan mẫu hoa Thiên lý lên sự biểu hiện của các gen *BDNF*, *NGF*, *acetyl H3***

Trong nghiên cứu này, mức độ biểu hiện của 3 gen *NGF*, *BDNF* và *acetyl H3* được đánh giá sau 24h xử lý với dịch chiết *n*-hexan hoa Thiên lý. Kết quả thể hiện trong Hình 3.13 cho thấy khi tế bào C6 được xử lý với cao chiết hexan đã làm tăng mức độ biểu hiện của các gen lên đáng kể. Kết quả Real-time PCR cho thấy rằng biểu hiện của *NGF*, *BDNF* và *acetyl H3* tăng lên đáng kể khi tế bào được xử lý với chiết xuất hoa Thiên lý (hexane) so với nhóm đối chứng (DMSO). Ngoài ra, mức độ biểu hiện cũng thể hiện sự phụ thuộc vào nồng độ xử lý. Sau 24 giờ xử lý các tế bào với chiết xuất hoa Thiên lý (hexane) làm tăng cường mức độ biểu hiện của các gen *NGF*, *BDNF* và *acetyl H3* tăng lần lượt 3,16; 2,09 và 1,95 so với nhóm đối chứng âm DMSO 0,1% khi tế bào được xử lý ở nồng độ 5  $\mu$ g/ml. Kết quả này chứng minh tiềm năng hoạt tính của cao chiết hexan từ hoa Thiên lý có ảnh hưởng làm tăng mức độ biểu hiện của các gen liên quan đến tế bào thần kinh ở mức độ mRNA phụ thuộc vào nồng độ. Nhóm nghiên cứu tiếp tục tiến hành đánh giá mức độ biểu hiện của protein các gen này lên tế bào thần kinh C6 của cao chiết *n*-hexan mẫu Thiên lý.



**Hình 3. 13.** Mức độ biểu hiện của các gen NGF, BDNF và acetyl H3 ở tế bào thần kinh C6 được xử lý với dịch chiết hexan mẫu hoa Thiên lý ở các nồng độ 1 µg/ml; 2,5 µg/ml; 5 µg/ml. Kết quả được thể hiện dưới dạng Trung bình ± SD. Ý nghĩa thống kê được phân tích sử dụng ANOVA. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 và \*\*\*\*p < 0.0001

### 3.6. Đánh giá mức độ ảnh hưởng của dịch chiết mẫu hoa Thiên lý lên sự biểu hiện của các protein Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Nerve Growth Factor (NGF), acetyl H3

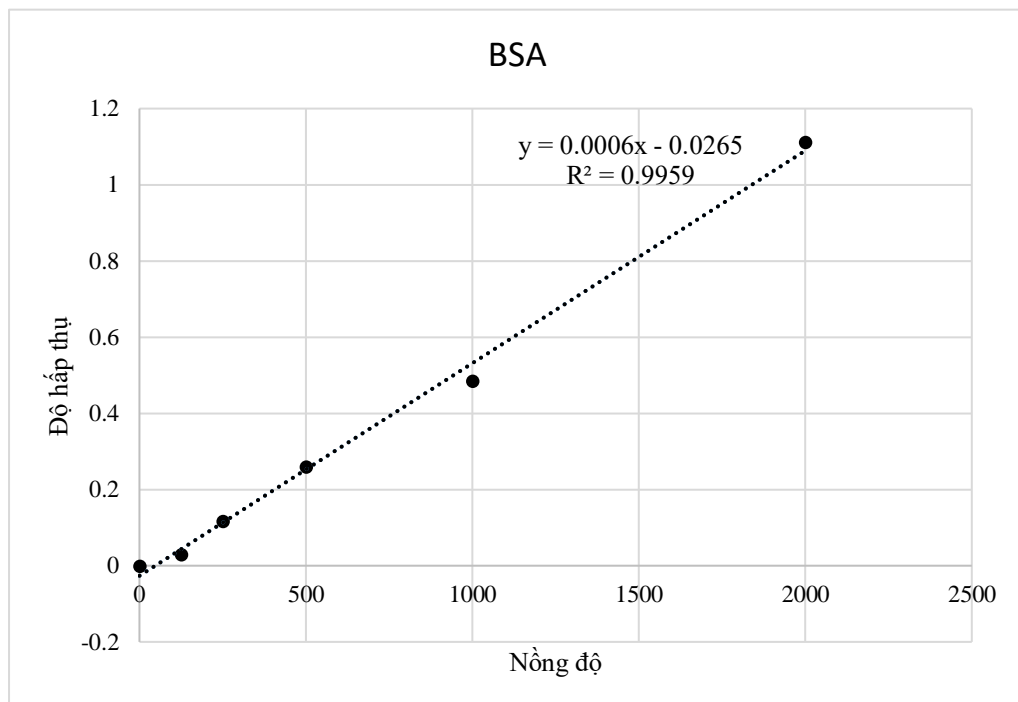
#### 3.6.1. Kết quả định lượng protein của dịch chiết n-hexan mẫu hoa Thiên lý

##### ❖ Kết quả định lượng protein dịch chiết n-hexan mẫu Thiên lý

Từ số liệu đo OD ở Bảng 3.6, chúng tôi có kết quả biểu đồ ở Hình 3.14 thể hiện tỷ lệ pha loãng 1/5 và dãy đường chuẩn nồng độ 0; 125; 250; 500; 1000 và 2000 µg/ml. Với mỗi tỷ lệ thể tích mẫu và tổng thể tích giếng khác nhau, dựng đường chuẩn ở các dải nồng độ tương ứng với 6 điểm. Ở tỷ lệ 1/5, đường chuẩn được dựng để tìm ra nồng độ của các mẫu protein. Tại đường chuẩn dựng được từ 6 nồng độ khác nhau ở tỷ lệ 1/5, hệ số  $R^2$  của đường chuẩn khá cao đạt 0,9959. Điều này cho thấy rằng mô hình hồi quy tuyến tính của dãy nồng độ phù hợp với tập dữ liệu đến 99,59% hay nói cách khác, 99,59% biến thiên OD được giải thích bởi nồng độ và 0,41% được giải thích bằng các biến ngoài mô hình và sai số ngẫu nhiên. Vì vậy, đường chuẩn của dãy nồng độ phù hợp để sử dụng tính toán nồng độ mẫu protein.

**Bảng 3. 6.** Kết quả đo OD của protein chuẩn các nồng độ khác nhau

<b>BSA</b>	<b>Lần 1</b>	<b>Lần 2</b>	<b>Trung bình</b>	<b>Trung bình - Blank</b>
<b>0 µg/ml</b>	0,1843	0,1563	0,1703	0
<b>125 µg/ml</b>	0,2041	0,1967	0,2004	0,0301
<b>250 µg/ ml</b>	0,2886	0,2858	0,2872	0,1169
<b>500 µg/ ml</b>	0,4296	0,4318	0,4307	0,2604
<b>1000 µg/ ml</b>	0,6516	0,658	0,6548	0,4845
<b>2000 µg/ ml</b>	1,2898	1,274	1,2819	1,1116

**Hình 3. 14.** Biểu đồ xây dựng đường chuẩn BSA mẫu hoa Thiên lý

**Bảng 3.7.** Nồng độ protein từ mỗi mẫu sau khi định lượng bằng kit BCA

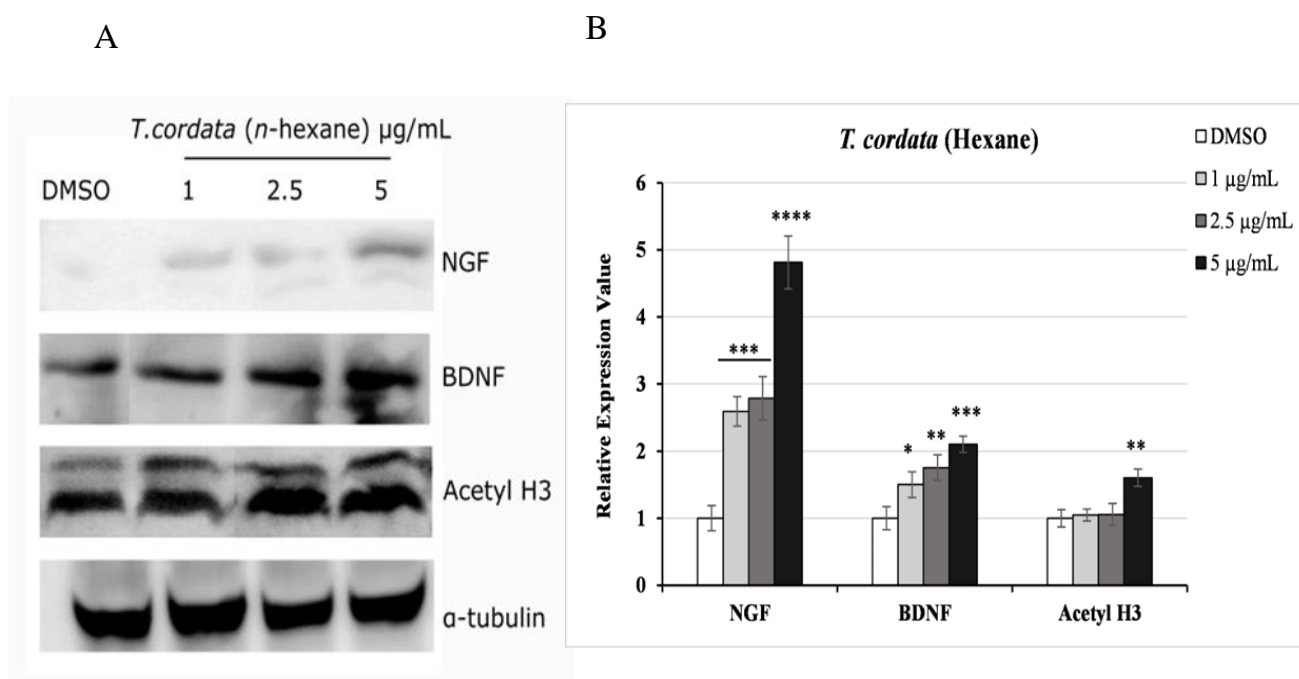
Mẫu	Lần 1	Lần 2	Trung bình	Trung bình - Blank	Nồng độ ( $\mu\text{g/ml}$ )	V for 30 $\mu\text{g}$ protein ( $\mu\text{l}$ )	V dye ( $\mu\text{l}$ )	V H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{l}$ )
DMSO	0,9101	0,84	0,87505	0,77315	7164,15	4,19	7,50	18,31
HTL(Hex) 1 $\mu\text{g/ml}$	0,8822	0,8261	0,85415	0,75225	6976,91	4,30	7,50	18,20
HTL(Hex) 2,5 $\mu\text{g/ml}$	0,8482	0,8519	0,85005	0,74815	6940,18	4,32	7,50	18,18
HTL(Hex) 5 $\mu\text{g/ml}$	0,8597	0,8261	0,8429	0,741	6876,13	4,36	7,50	18,14

Từ kết quả Bảng 3.7. cho thấy nồng độ protein ở mẫu DMSO cao nhất với giá trị 7164,15  $\mu\text{g/ml}$ , nồng độ protein dịch chiết *n*-hexan mẫu hoa Thiên lý 5  $\mu\text{g/ml}$  thấp nhất với giá trị 6876,13  $\mu\text{g/ml}$ . Pha loãng mẫu 5 lần nằm trong khoảng tuyến tính của đường chuẩn. Kết quả cho thấy rằng nồng độ protein tổng số giữa xử lý mẫu ở các nồng độ khác nhau và đối chứng DMSO 0,1% gần như là tương đương. Như vậy, quá trình điều trị với các mẫu ở các nồng độ khác nhau không gây chết tế bào thần kinh C6. Nhìn chung, nồng độ protein ở các mẫu ở ngưỡng tương đối cao, đủ điều kiện cho làm thí nghiệm Western blot.

### **3.6.2. Ảnh hưởng của dịch chiết hoa Thiên lý lên sự biểu hiện của các protein BDNF, NGF và acetyl H3**

Để xác định xem chiết xuất hexane của hoa Thiên lý có ảnh hưởng đến sự biểu hiện của các yếu tố tế bào thần kinh hay không, chúng tôi đã đánh giá hàm lượng protein của BDNF, NGF và acetyl H3 trong tế bào C6 sau khi điều trị với dịch chiết *n*-hexan mẫu hoa Thiên lý ở các nồng độ khác nhau 1  $\mu\text{g/ml}$ , 2,5  $\mu\text{g/ml}$  và 5  $\mu\text{g/ml}$  sau 48h. Kết quả thể hiện trong Hình 3.15 cho thấy, mức độ biểu hiện của protein NGF khi tế bào được xử lý bằng chiết xuất hoa Thiên lý (hexane) ở mức 5  $\mu\text{g/ml}$  tăng đáng kể gấp khoảng năm lần so với nhóm đối chứng. Tương tự như vậy, các yếu tố liên quan đến thần kinh khác, BDNF và histone H3, cho thấy sự tăng trưởng đáng kể ở cùng nồng độ, tăng lần lượt khoảng hai lần và 1,6 lần theo thứ tự. Những phát hiện này chứng minh rằng chiết xuất hexane của hoa Thiên lý ảnh hưởng đáng kể đến sự biểu hiện của các protein liên quan đến tế bào thần kinh. Do đó, những kết quả này chỉ ra rằng chiết xuất *n*-hexane mẫu hoa Thiên lý có thể tăng cường sự biểu hiện của các protein liên quan đến thần kinh. Các kết quả này thể hiện cao chiết hexan từ hoa Thiên lý có tiềm năng trong phát triển các sản phẩm hỗ trợ điều trị các bệnh suy giảm trí nhớ.

Nerve growth factor (NGF) có chức năng quan trọng trong việc thúc đẩy sự biệt hóa, sự sống còn của tế bào thần kinh và kích thích sự phát triển của sợi trục thần kinh [84]. Do đặc tính dinh dưỡng thần kinh, NGF như một đích điều trị đầy tiềm năng cho các can thiệp điều trị trong các bệnh thoái hóa thần kinh, bao gồm chứng suy giảm trí nhớ [85-88]. Yếu tố dinh dưỡng thần kinh (BDNF) thuộc họ yếu tố tăng trưởng thần kinh, BDNF hoạt động như một protein có ý nghĩa trong việc thúc đẩy sự sống còn và mở rộng của tế bào thần kinh trong cả hệ thần kinh trung ương và ngoại biên. Hơn nữa, BDNF đóng vai trò then chốt trong các giai đoạn phát triển ban đầu, điều chỉnh sự tăng sinh và biệt hóa của tiền thân tế bào thần kinh, sự sống còn của tế bào, sự phát triển của sợi trục thần kinh, cũng như thiết lập và tinh chỉnh động lực của các kết nối synap [89-91]. Có bằng chứng ủng hộ sự tham gia của các sửa đổi histone, đặc biệt là acetylation H3 và H4, trong sự biệt hóa tế bào gốc hoặc tiền thân tế bào thần kinh và hoạt động dinh dưỡng thần kinh. Hơn nữa, các biệt hóa thần kinh này có liên quan đến sự biệt hóa thần kinh do chất ức chế histone deacetylase (HDACi) gây ra và hoạt động dinh dưỡng thần kinh [92]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, chúng tôi đã quan sát thấy sự gia tăng đáng kể nồng độ mRNA và protein BDNF, NGF và acetyl H3 trong tế bào thần kinh C6 sau khi điều trị bằng chiết xuất HTL, so với điều trị bằng đối chứng âm DMSO 0,1%. Những phát hiện này cho thấy rằng chiết xuất HTL có thể có tác động tích cực đến các yếu tố dinh dưỡng thần kinh và sửa đổi histone, có thể có lợi cho chức năng thần kinh và các chiến lược điều trị tiềm năng trong các tình trạng thoái hóa thần kinh.



**Hình 3. 15.** Mức độ biểu hiện của một số protein ở tế bào thần kinh khi được xử lý với cao chiết hexan từ hoa Thiên lý (A-B). (A) Phân tích Western blot các

marker liên quan đến tế bào thần kinh, yếu tố tăng trưởng thần kinh (NGF), yếu tố dinh dưỡng thần kinh có nguồn gốc từ não (BDNF) và acetyl H3 trong các tế bào C6.

(B) Phân tích định lượng mức độ biểu hiện protein NGF, BDNF và acetyl H3 trong các tế bào C6. Dữ liệu định lượng được lấy từ ba thí nghiệm độc lập. Dữ liệu được trình bày dưới dạng Trung bình  $\pm$  SD. Ý nghĩa thống kê giữa các mẫu được xử lý đối chứng được phân tích bằng ANOVA. \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  so với tế bào C6 được xử lý DMSO.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

Từ các nghiên cứu đã đạt được, nhóm nghiên cứu rút ra một số kết luận sau:

1. Đã đánh giá được hoạt tính ức chế AChE của tổng cộng 4 cao chiết từ mẫu hoa Thiên lý. Kết quả ghi nhận cao chiết hexan từ hoa Thiên lý cho hoạt tính ức chế AChE cao nhất với giá trị  $IC_{50}$  đạt  $6,196 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$ . Thêm vào đó, các cao chiết EtOH và BuOH từ hoa Thiên lý cũng thể hiện hoạt tính ức chế AChE tương đối cao với giá trị  $IC_{50}$  lần lượt là  $8,352 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$  và  $13,474 \pm 0,48 \mu\text{g/ml}$  so với đối chứng dương Berberin chloride có giá trị  $IC_{50}$  đạt  $0,289 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$ .

2. Đã kiểm tra hoạt tính kéo dài sợi trục neuron của tất cả 4 cao chiết từ mẫu hoa lên tế bào thần kinh. Kết quả cho thấy, các dịch chiết tách từ hoa Thiên lý cho thấy khả năng kéo dài sợi trục neuron đáng kể. Đáng chú ý, dịch chiết hexan mẫu hoa Thiên lý cho thấy hoạt tính kéo dài sợi trục neuron mạnh mẽ nhất ở cả 2 nồng độ nghiên cứu là  $2,5 \mu\text{g/ml}$  và  $5 \mu\text{g/ml}$  với chiều dài sợi trục neuron lần lượt là  $41,74 \pm 4,26 \mu\text{m}$  và  $43,18 \pm 5,62 \mu\text{m}$ , tương ứng.

3. Đã đánh giá được sự biểu hiện của một số gen và một số protein liên quan đến thần kinh như BDNF, NGF và acetyl H3 tăng đáng kể khi xử lý với dịch chiết hexan mẫu hoa Thiên lý. Mức độ biểu hiện cũng phụ thuộc vào nồng độ xử lý ở cả mức độ biểu hiện mRNA và protein.

### KIẾN NGHỊ

Dựa trên các kết quả nghiên cứu tiềm năng đã đạt được, đặc biệt với cao chiết hexan từ hoa Thiên lý, chúng tôi đưa ra một số kiến nghị cho phép nhóm nghiên cứu được kế tục nghiên cứu theo hướng đang thực hiện với 2 mục tiêu chính như sau:

1. Đề nghị nghiên cứu thêm về cơ chế biểu hiện các gen và protein liên quan đến thần kinh đối với cao chiết từ hoa Thiên lý.

2. Tách chiết chất sạch từ cao chiết hexan mẫu hoa Thiên lý và đánh giá hoạt tính ức chế AChE, kéo dài sợi trục neurite tế bào thần kinh của chất sạch đó.



**DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN**

1. **Doan T.N.**, Nguyen M.H., Bui T.T.L., Nguyen T.T.H., Nguyen H.D. and Nguyen V.T. (2023). Hexane extract of *Telosma cordata* enhances neurite outgrowth via the epigenetically regulated genes expression in neuronal cells. Not Bot Horti Agrobo. 51(4):13204.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wang, Y., et al., 2010, Retrospect and prospect of active principles from Chinese herbs in the treatment of dementia, *Acta Pharmacol Sin*, 31(6), p. 649-64.
2. Alzobaidi, N., et al., 2021, Bioactive Compounds and Traditional Herbal Medicine: Promising Approaches for the Treatment of Dementia, *Degener Neurol Neuromuscul Dis*, 11, p. 1-14.
3. International, A.s.D., 2018, World Alzheimer Report 2018, *London (GB): ADI*.
4. Prince, M., et al., 2013, The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis, *Alzheimers Dement*, 9(1), p. 63-75.e2.
5. WHO, 2022, Dementia, p. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
6. Bakulski, K.M., et al., 2020, Heavy Metals Exposure and Alzheimer's Disease and Related Dementias, *J Alzheimers Dis*, 76(4), p. 1215-1242.
7. Balkrishna, A., et al., 2019, Anti-acetylcholinesterase activities of mono-herbal extracts and exhibited synergistic effects of the phytoconstituents: A biochemical and computational study, *Molecules*, 24(22).
8. Taqui, R., et al., 2022, Advances on plant extracts and phytochemicals with acetylcholinesterase inhibition activity for possible treatment of Alzheimer's disease, *Phytomedicine Plus*, 2(1), p. 100184.
9. Seong, S.H., et al., 2017, BACE1 inhibitory activity and molecular docking analysis of meroterpenoids from *Sargassum serratifolium*, *Bioorg Med Chem*, 25(15), p. 3964-3970.
10. Pagliosa, L.B., et al., 2010, Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on in vitro acetylcholinesterase activity, *Phytomedicine*, 17(8-9), p. 698-701.
11. Rangsinth, P., et al., 2021, *Caesalpinia mimosoides* Leaf Extract Promotes Neurite Outgrowth and Inhibits BACE1 Activity in Mutant APP-Overexpressing Neuronal Neuro2a Cells, *Pharmaceuticals (Basel)*, 14(9).
12. Rigby, M.J., T.M. Gomez, and L. Puglielli, 2020, Glial Cell-Axonal Growth Cone Interactions in Neurodevelopment and Regeneration, *Frontiers in Neuroscience*, 14.

13. Gao, Y., et al., 2019, The Rho kinase inhibitor fasudil attenuates A $\beta$ 1–42-induced apoptosis via the ASK1/JNK signal pathway in primary cultures of hippocampal neurons, *Metabolic Brain Disease*, 34(6), p. 1787-1801.
14. Mitre, M., A. Mariga, and M.V.J.C.s. Chao, 2017, Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology, *Clin Sci (Lond)*, 131(1), p. 13-23.
15. Park, S.J., et al., 2015, Emodin induces neurite outgrowth through PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ -mediated signaling pathways in Neuro2a cells, *Neurosci Lett*, 588, p. 101-7.
16. More, S.V., et al., 2012, The role of bioactive compounds on the promotion of neurite outgrowth, *Molecules*, 17(6), p. 6728-6753.
17. Duangjan, C., et al., 2021, Anacardium occidentale L. leaf extracts protect against glutamate/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative toxicity and induce neurite outgrowth: The involvement of SIRT1/Nrf2 signaling pathway and teneurin 4 transmembrane protein, *Front Pharmacol*, 12, p. 627738.
18. Li, X.-W., et al., 2022, Mechanism of neural regeneration induced by natural product LY01 in the 5 $\times$ FAD mouse model of Alzheimer's disease, *Front Pharmacol*, 13.
19. Jing, P.Y., Zhou; Yizhe, Sun; Tao, Wang; Jingya, Yang., 2014, Preliminary exploration of a novel type high-efficiency mosquito-repellent compound essential oils, *Animal Husbandry and Feed Science; Cranston*, 6(4), p. 170-172.
20. Lim, T.K., *Telosma cordata*, in *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants: Volume 7, Flowers*, T.K. Lim, Editor. 2014, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 107-110.
21. Wang, S., et al., 2022, The study of phenolics from *Telosma cordata* (Burm. f.) Merr. flowers as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors: in-vitro assessment and molecular docking, *Arch Clin Psychiatry*, 49(3).
22. Buathong, R. and S.J.P. Duangrisai, 2023, Plant ingredients in Thai food: a well-rounded diet for natural bioactive associated with medicinal properties, *PeerJ*, 11, p. e14568.
23. Cajuday, L. and E. Amparado, 2014, Hypoglycemic property of *Telosma procumbens* (Blanco) Merr. (Apocynaceae) in normal and alloxan-induced diabetic juvenile mice (*Mus musculus*), *Journal of Phytopharmacology*, 3, p. 113-117.

24. Ngoitaku C, K.P., Riangwong K, 2016, Total phenolic content and antioxidant activities of edible flower tea products from Thailand, *International Food Research Journal*, 23, p. 2286-2290.
25. Huang, W.Y., Y.Z. Cai, and Y. Zhang, 2010, Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention, *Nutr Cancer*, 62(1), p. 1-20.
26. Online, P.o.t.W.,  
<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:102157-1#higher-classification>.
27. Muzamil, M.J.S.T.J., 2004, A note on the morphology of *Telosma cordata* (Burm. F.) Merr (Asclepiadaceae)/H. Sarina, M. Muzamil and I. Rosmahaiza, p. 113-117.
28. Tanaka, Y.V.K., Nguyen, 2007, *Edible Wild Plants of Vietnam: The Bountiful Garden*. Thailand: Orchid Press, (ISBN 978-9745240896), p. 36.
29. Aral, T., et al., 1993, Volatile components of *Telosma cordata* Merrill flowers, 8(4), p. 221-223.
30. Fatima, M. and M.J.C.C.R.I. Rashid Khan, Protective Effects of Methanolic Extract of *Telosma cordata* against Aceclofenac Induced Hepatotoxicity in Rats, 1564.
31. Wang, S., et al., 2022, The study of phenolics from *Telosma cordata* (Burm. f.) Merr. flowers as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors: in-vitro assessment and molecular docking, 49(3).
32. Le, M.H.J.J.o.M.M.-H., 2005, Braca Alessandra: Studies on chemical composition from the leaves of *Telosma cordata*, p. 41-45.
33. Shin, J.H., 2022, Dementia Epidemiology Fact Sheet 2022, *Ann Rehabil Med*, 46(2), p. 53-59.
34. Livingston, G., et al., 2020, Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission, *The Lancet Commissions*, 396(10248), p. 413-446.
35. Moss, G.P., 2021, Enzyme Nomenclature <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/>, *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*.

36. Taylor, P.J.G. and G.s.t.p.b.o. therapeutics, 2006, Anticholinesterase agents, 11, p. 201-216.
37. illustratae, I.c.f.J.E.S.a.J.S.I.p.p.r.d.e.o.
38. Walczak-Nowicka Ł, J. and M. Herbet, 2021, Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Neurodegenerative Diseases and the Role of Acetylcholinesterase in their Pathogenesis, *Int J Mol Sci*, 22(17).
39. Nasrolahi, A., et al., 2022, Therapeutic potential of neurotrophic factors in Alzheimer's Disease, p. 1-13.
40. Cuello, A.C., R. Pentz, and H.J.F.i.n. Hall, 2019, The brain NGF metabolic pathway in health and in Alzheimer's pathology, 13, p. 441218.
41. Zhou, L.-T., et al., 2021, Elevated levels of miR-144-3p induce cholinergic degeneration by impairing the maturation of NGF in Alzheimer's disease, 9, p. 667412.
42. Silakarma, D. and A.A.R.J.B.M.J. Sudewi, 2019, The role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cognitive functions, 8(2), p. 518-525.
43. Yang, B., et al., 2017, Altered expression of BDNF, BDNF pro-peptide and their precursor proBDNF in brain and liver tissues from psychiatric disorders: rethinking the brain–liver axis, 7(5), p. e1128-e1128.
44. Colucci-D'Amato, L., L. Speranza, and F.J.I.j.o.m.s. Volpicelli, 2020, Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer, 21(20), p. 7777.
45. Franzmeier, N., et al., 2021, The BDNF Val66Met SNP modulates the association between beta-amyloid and hippocampal disconnection in Alzheimer's disease, 26(2), p. 614-628.
46. Qiu, J., et al., 2017, Screening and Identifying Antioxidative Components in Ginkgo biloba Pollen by DPPH-HPLC-PAD Coupled with HPLC-ESI-MS2, *PLOS ONE*, 12(1), p. e0170141.
47. Qiu, J., et al., 2017, Screening and identifying antioxidative components in Ginkgo biloba pollen by DPPH-HPLC-PAD coupled with HPLC-ESI-MS2, 12(1), p. e0170141.
48. Latif, M.S., *Antioxidant and anticholinesterase activities of centella asiatica phenolic extract-mediated gold nanoparticles*. 2019, Universiti Tun Hussein Onn Malaysia.

49. Lee, M.K., et al., 2000, Asiatic acid derivatives protect cultured cortical neurons from glutamate-induced excitotoxicity, 108(1-2), p. 75-86.
50. Hạnh, N.B., B.T. Tùng, and N.T.K. Thu, 2017, Đánh giá tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro* của các phân đoạn dịch chiết Hoàng liên chân gà (*Coptis chinensis* Franch, họ Ranunculaceae), *Tạp chí Dược học*, 57(8).
51. Vũ Thị Ngọc, P.T.H., Lê Thị Lan Anh, Nguyễn Tiến Đạt, Lê Thị Bích Thủy, 2016, Định tính và định lượng Huperzine A trong cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) ở Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 14(3).
52. Fatima, M. and M. Rashid Khan, 2023, Protective Effects of Methanolic Extract of *Telosma cordata* against Aceclofenac Induced Hepatotoxicity in Rats, *Clinical Case Reports International*, 7(1564).
53. Lợi, Đ.T., 2004, Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, *NXB Y học*.
54. Chi, V.V., 2004, Từ điển thực vật thông dụng, *Tập 1. Nxb khoa học kỹ thuật*.
55. Endress, M., S. Liede-Schumann, and U. Meve, 2014, An updated classification for Apocynaceae, *Phytotaxa*, 159.
56. Wilkinson, M.J., et al., 2017, Replacing Sanger with Next Generation Sequencing to improve coverage and quality of reference DNA barcodes for plants, 7(1), p. 46040.
57. Phụng, N.K.P., 2007, Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ, *NXB Đại học Quốc gia TP HCM*.
58. V, D.đ.V.N., 2017, Chuyên luận dược liệu, *Nhà xuất bản Y học*.
59. Tiwari, S., et al., 2020, Phytochemical Screening, Antibacterial-Guided Fractionation, and Thin-Layer Chromatographic Pattern of the Extract Obtained from *Diploknema butyracea*, *Pharmacognosy Research*, 12(4), p. 437-443.
60. Logesh, R. and S.V. Sathasivampillai, 2023, A triterpenoid saponin bacoside-A3 from the aerial parts of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. with acetylcholinesterase enzyme combating Alzheimer's disease, *South African Journal of Botany*, 156, p. 177-185.
61. 2012, 2012 Alzheimer's disease facts and figures, *Alzheimers Dement*, 8(2), p. 131-68.

62. Luzak, B., P. Siarkiewicz, and M.J.T.i.V. Boncler, 2022, An evaluation of a new high-sensitivity PrestoBlue assay for measuring cell viability and drug cytotoxicity using EA. hy926 endothelial cells, *Toxicology in Vitro*, 83, p. 105407.
63. Zhang, J.-R., et al., 2022, Systematic screening and validation of reliable reference genes for qRT-PCR analysis in Okra (*Abelmoschus esculentus* L.), *Scientific Reports*, 12(1), p. 12913.
64. Gamage, C.D.B., et al., 2023, Libertellenone T, a novel compound isolated from endolichenic fungus, induces G2/M phase arrest, apoptosis, and autophagy by activating the ROS/JNK pathway in colorectal cancer cells, *Cancers (Basel)*, 15(2), p. 489.
65. Fernández Moriano, C., et al., 2015, Antioxidant and cytoprotective potentials of Parmeliaceae lichens and identification of active compounds, *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 81, p. 164-178.
66. Bruni, I., et al., 2010, Identification of poisonous plants by DNA barcoding approach, *Int J Legal Med*, 124(6), p. 595-603.
67. Begerow, D., et al., 2010, Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures, *Appl Microbiol Biotechnol*, 87(1), p. 99-108.
68. Loera-Sánchez, M., B. Studer, and R. Kölliker, 2020, DNA barcode trnH-psbA is a promising candidate for efficient identification of forage legumes and grasses, *BMC Research Notes*, 13(1), p. 35.
69. Saha, K., et al., 2020, DNA barcoding of selected Zingiberaceae species from North-East India, 29(3), p. 494-502.
70. Bruni, I., et al., 2015, A DNA barcoding approach to identify plant species in multiflower honey, *Food Chem*, 170, p. 308-15.
71. Nadi, M., F. Fikri, and M.T.E. Purnama, 2020, Determination of Capsaicin Levels in *Capsicum annum* Linn Ethanollic Extract using Thin Layer Chromatography Analysis, *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(6), p. 661-664.
72. Chaudhary, S.K., et al., 2020, Thin-layer chromatographic analysis of mangiferin (a bioactive antioxidant from dietary plant sources): a mini-review, *JPC – Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 33(4), p. 341-352.

73. Tiwari, S., 2022, Phytochemical Screening, Antibacterial-Guided Fractionation and Thin Layer Chromatographic Pattern of the Extract Obtained from *Diploknema butyreaceae*, *Pharmacogn. Res.*, 12, p. 437-443.
74. Ferlemi, A.-V., et al., 2014, Lead-induced effects on learning/memory and fear/anxiety are correlated with disturbances in specific cholinesterase isoform activity and redox imbalance in adult brain, 131, p. 115-122.
75. Martini, F., et al., 2018, Ebselen inhibits the activity of acetylcholinesterase globular isoform G4 in vitro and attenuates scopolamine-induced amnesia in mice, *J Cell Biochem*, 119(7), p. 5598-5608.
76. Behl, T., et al., 2020, Distinctive evidence Involved in the role of endocannabinoid signalling in Parkinson's disease: A perspective on associated therapeutic interventions, *Int J Mol Sci*, 21(17).
77. Abdullah, A., et al., 2019, Activation of aryl hydrocarbon receptor signaling by a novel agonist ameliorates autoimmune encephalomyelitis, *PLoS One*, 14(4), p. e0215981.
78. Benfante, R., et al., 2021, Acetylcholinesterase inhibitors targeting the cholinergic anti-inflammatory pathway: a new therapeutic perspective in aging-related disorders, *Aging Clin Exp Res*, 33(4), p. 823-834.
79. Li, P., et al., 2019, Screening of acetylcholinesterase inhibitors and characterizing of phytochemical constituents from *Dichocarpum auriculatum* (Franch.) WT Wang & PK Hsiao through UPLC-MS combined with an acetylcholinesterase inhibition assay in vitro, *J Ethnopharmacol*, 245, p. 112185.
80. Reznichenko, L., et al., 2005, Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate induces neurorescue of long-term serum-deprived PC12 cells and promotes neurite outgrowth, *J Neurochem*, 93(5), p. 1157-67.
81. Chen, G., et al., 2009, Cyanidin-3-glucoside reverses ethanol-induced inhibition of neurite outgrowth: role of glycogen synthase kinase 3 Beta, *Neurotox Res*, 15(4), p. 321-31.
82. Hannan, M.A., et al., 2014, *Moringa oleifera* with promising neuronal survival and neurite outgrowth promoting potentials, *Journal of Ethnopharmacology*, 152(1), p. 142-150.
83. Numakawa, T. and H. Odaka, 2022, The Role of Neurotrophin Signaling in Age-Related Cognitive Decline and Cognitive Diseases, 23(14), p. 7726.



84. Bradshaw, R.A., W. Mobley, and R.A. Rush, 2017, Nerve growth factor and related substances: A brief history and an introduction to the international NGF meeting series, *Int J Mol Sci*, 18(6).
85. Xu, D., et al., 2019, Efficient delivery of nerve growth factors to the central nervous system for neural regeneration, *Adv Mater*, 31(33), p. 1900727.
86. Do Carmo, S., B. Kannel, and A.C.J.C. Cuello, 2021, The nerve growth factor metabolic pathway dysregulation as cause of Alzheimer's cholinergic atrophy, *Cells*, 11(1), p. 16.
87. Triaca, V., et al., 2021, NGF and the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease: from molecular players to neuronal circuits, p. 145-165.
88. Eu, W.Z., et al., 2021, The effect of nerve growth factor on supporting spatial memory depends upon hippocampal cholinergic innervation, *Transl Psychiatry*, 11(1), p. 162.
89. Allen, M., et al., 2013, HuD promotes BDNF expression in brain neurons via selective stabilization of the BDNF long 3'UTR mRNA, *PLoS One*, 8(1), p. e55718.
90. Amen, A.M., D.L. Pham, and M.K. Meffert, *Post-transcriptional Regulation by Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Nervous System*, in *Post-transcriptional Mechanisms in Endocrine Regulation*, P.K.M.J. Menon and P.A. Goldstrohm, Editors. 2016, Springer International Publishing: Cham. p. 315-337.
91. Arévalo, J.C. and R. Deogracias, 2023, Mechanisms controlling the expression and secretion of BDNF, *Biomolecules*, 13(5), p. 789.
92. Ngubo, M., J.L. Reid, and H.G.J.P.o. Patterton, 2022, Distinct structural groups of histone H3 and H4 residues have divergent effects on chronological lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*, *PLoS One*, 17(5), p. e0268760.

## PHỤ LỤC

**3.1.2. Trình tự gen mẫu hoa Thiên lý sử dụng các môi khác nhau**

- Giải trình tự với môi *matK\_F* mẫu Thiên lý:

TATACTTTATTCGATACAAACTATTTTTTTTTGGAAGATCCGCTATG  
 ATAATGAGAAAGGTTTCTGCATATACGCCCAAATCTGTCCATAATATCM  
 SAATCTGCTAAATCAGTCCAAACCAGCTTACTAATGGGATGTCCTAATA  
 GGTTACAAAATTTCTCTTTAGCCAATGATCCAATCAGAGGAATAATTGG  
 AACAATGGTATCTAATTTCTTATTCCTAATGGCATTATTAATTARAAATG  
 AATTTTCGAGCATTGACTCCGTACCCTTGAAGGGTTTAGTCGCACAATT  
 GAAAGATAACCCATAAAGTCAAGGGAATTTTTGTACAATTGCTTTATAT  
 GGGCCCTTCGCGAGTGAAACCACAGGTCAAATTACATTGCCAAAAATT  
 GACAAGGTACGATTTCCATTTATTCATCAAAGAGCCGTCCCCCTTGAA  
 AGCAGAATGGATTTTCCTTGATACCTAACATAATGCATGAAAGGATATT  
 TGACCAAGCATAAATTGGTCGGAAAATCCTTAGCGAAGACTTCGGCAAG  
 ACGTTCGATTTTTCCATAGAAATAGATTCGTTCAAGAAGGGCCCCAAAG  
 GATGTTGGTCGTAAATGAGAAGATTGTTTATGGAGAAAGACGAAAATG  
 GATTCGTATTCACATACATAAAAATTATATAACAAGAAAATAATCGTT  
 GATTTCTTTTTAGATTTCTTTTTGTAAAAAATGAAAAGTTTCTTTTC  
 TGGTTTTTTTTGTAGCAATAATCTTATTGCAATTACAATACTCGCGTAGA  
 AAGAATCGTAATAAGTGCAAAAAAGGGGCATCTTTTACCCAATAGCGA  
 AGGGTTTGAACCAATATTTCCCAGATGGAA

- Giải trình tự với môi *matK\_R* mẫu Thiên lý:

TTTTTGCACCTTATTACGATTCTTTCTACGCGAGTATTGTAATTGCA  
 ATAAGATTATTGCTACARAAAAACCAGAAAGAAAACCAGTTTTCATTT  
 TTTAACAAAAAGAAATCTAAAAAGAAATCAACGATTATTTTTCTTGTTA  
 TATAATTTTTATGTATGTGAATACGAATCCATTTTCGTCTTTCTCCATAA  
 ACAATCTTCTCATTACGACCAACATCCTTTGGGGCCCTTCTTGAACGAA  
 TCTATTTCTATGGAAAAATCGAACGTCTTGCCGAAGTCTTCGCTAAGGAT  
 TTTCCGACCAATTTATGCTTGGTCAAATATCCTTTCATGCATTATGTTAG  
 GTATCAAGGAAAATCCATTCTGCTTTCAAGGGGGACGGCTCTTTTGATG  
 AATAAATGGAAATCGTACCTTGTCATTTTTGGCAATGTAATTTTGACCT  
 GTGGTTTCACTCGCGAAGGGCCCATATAAAGCAATTGTACAAAAATTCC  
 CTTGACTTTATGGGTTATCTTTCAATTGTGCGACTAAACCCTTCAAGGGT  
 ACGGAGTCAAATGCTCGAAAATTCATTTCTAATTAATAATGCCATTAGG  
 AATAAGAAATTAGATACCATTGTTCCAATTATTCCTCTGATTGGATCATT

GGCTAAAGAGAAATTTTGTAACCTATTAGGACATCCCATTAGTAAGCTG  
 GTTTGGACTGATTTAGCAGATTCTGATATTATGGACAGATTTGGGCGTAT  
 ATGCAGAAACCTTTCTCATTATCATAGCGGATCTTCCAAAAAAATAGT  
 TTGTATCGAATAAAGTATATACTTCGACTTTCTTGTGCTAAAACCTTTAGC  
 TCGTAAACATAAAARGTACGGTA

- Giải trình tự với môi *PsbA-trnH\_F* mẫu Thiên lý:

GTTGGCACATATCAGMGCTCTTGATAGAACAAGAAGGTGATATTG  
 CTCCTTTATTTGCTTTTTATTTGGTACATTATCAAAAATTGAAATATACC  
 AGAAAAAATTGAAATATATCAGAAAAAAAAGGTTCGAAACCATATTCTA  
 AATAAAATTGAATTTTTAATTCAATTTAAATTTCTTAATATTAATCTAAA  
 TATATTAATATAAATTAATATAAATATATTATATAAATATATTAATAGAA  
 TTAAATTGTAATATTAATTAGAATATATTAATTAGAATATATTAAT  
 ATAAATTTATAATATTATAATATATATATATATAAATATAAAAATATA  
 ATATTAATATAACAATATTTTAWTTTTATTTTATTATAATTATAATTTTT  
 ATATAATATTTTAWTTCTAATATAAAAATCTAAATAGAAGAAATAAATAT  
 TAAATATATAGAAGAAATAAATATAAAGAGAGCGGGGGGGCGGATGT  
 AGCCAAGTGGATCAAGGCAGTGAAA

- Giải trình tự với môi *PsbA-trnH\_R* mẫu Thiên lý:

TTCTTCTATATATTTAATATTTATTTCTTCTATTTAGATTTTATATT  
 AGAATTAAAATATTATATAAAATATTATAATTATAATAAAATAAAATTA  
 AAATATTGKTATATTAATATTATATTTTATATTATATATATATATATA  
 TTATAATATTATAAATTTATATTTAATATATTCTAATTTAATATATTCTAA  
 TTTAATATTACAATTTAAATTCTATTAATATATTTATATAATATATTTATA  
 TTAATTTATATTAATATATTTAGATTAATATTAAGAAATTTAAATTGAAT  
 TAAAAATTCAATTTTATTTAGAATATGGTTTCGACCTTTTTTTTTCTGATAT  
 ATTTCAATTTTTCTGGTATATTTCAATTTTTGATARTGTACCAAATAAA  
 AAGCAAATARRGGAGCAATATCACCTTCTTGTCTATCAAGAGGGCAAT  
 ATTGCTCCTTTATTTTTCAATAACTCGTATACACTAAG

- Giải trình tự với môi *RbcL\_R* mẫu Thiên lý:

CGAAGACATTCATAAACCGCCCTACCGTAGTTTTTAGCTGATAAC  
 CCCAATTTTGGTTTWATARTACATCCCAACAGGGGACGACCATATTTGT  
 TCAATTTATCTCTCTCAACCTGGATGCCATGCGGTGGGCCTTGGAAGGTT  
 TTAATATAAGCCGTAGGGATTCGCAAATCTTCCAGACGTAGAGCGCGTA  
 GGGCTTTGAACCAAATACATTACCTACAATGGAAGTAAGCATGTTAGT  
 AACAGAACCTTCTTCAAAAAGGTCTAAAGGGTAAGCTACATAAGCAATA  
 AATTGATCTTCTTCTCCAGGAACGGGCTCGATATGGTAGCATCGCCCTTT

PL3

GTAACGATCAAGGCTGGTAAGTCCATCGGTCCAAACAGTTGTCCATGTA  
CCAGTAGAAGATTCGGCAGCTACCGCGGCCCTGCTTCTTCGGGTGGAA  
CTCCGGGTTGAGGAGTTACTCGGAATGCTGCCAAGATATCAGTATCTTTT  
GTTTCGTATTCAGGAGTATAATAAGTCAATTTGTACTCTTTAACACCAGC  
TTTGAATCCAACACTTGC

## Hexane extract of *Telosma cordata* enhances neurite outgrowth via the epigenetically regulated genes expression in neuronal cells

Nguyet Thi DOAN<sup>1</sup>, Hung Minh NGUYEN<sup>2</sup>, Tuyet Loan Thi BUI<sup>1</sup>,  
Huyen Trang Thi NGUYEN<sup>3</sup>, Duong Hoang NGUYEN<sup>1\*</sup>,  
Tru Van NGUYEN<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Vietnam Academy of Science and Technology, Center For High Technology Development,  
18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, 100000, Vietnam; [doannguyetkhtn@gmail.com](mailto:doannguyetkhtn@gmail.com); [tuyetloan.bui70@gmail.com](mailto:tuyetloan.bui70@gmail.com);  
[duongnh@gmail.com](mailto:duongnh@gmail.com) (\*corresponding author)

<sup>2</sup>Duy Tan University, College of Medicine and Pharmacy, Center for Pharmaceutical Biotechnology, Da Nang, 55000, Vietnam;  
[hungmolbio@gmail.com](mailto:hungmolbio@gmail.com)

<sup>3</sup>University of Science and Technology of Hanoi, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi,  
100000, Vietnam; [nguyen-thi-trang.buyen@usth.edu.vn](mailto:nguyen-thi-trang.buyen@usth.edu.vn)

<sup>4</sup>Vietnam Academy of Science and Technology, Institute of Biotechnology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, 100000, Vietnam;  
[nvtru@ibt.ac.vn](mailto:nvtru@ibt.ac.vn) (\*corresponding author)

---

### Abstract

*Telosma cordata* has long been consumed as foods and herbal medicine. The aim of this research is to investigate the potential biological activities of *Telosma cordata* flower (TCF) extracts and their molecular mechanisms in the treatment of neurological diseases, especially dementia. In general, the plant samples were successfully identified through DNA barcoding regions, utilizing *matK*, *trnH-psbA*, and *rbcL* markers. The ethanol extract and its fraction exhibited significantly high acetylcholinesterase inhibitory activity. Moreover, hexane extract of *T. cordata* displayed the most potent neurotrophic activity in a preliminary cell-based screening based on C6 cells neurite outgrowth. Additionally, hexane extract of *T. cordata* demonstrated the highest antioxidant activity. Finally, the hexane extract of *T. cordata* upregulated the expression of BDNF, NGF and acetyl H3 in C6 cells, affecting both mRNA and protein levels. These findings indicate that *Telosma cordata* could be a strong candidate for developing pharmacological drugs to treat dementia and neurodegenerative diseases.

**Keywords:** AChE inhibitory; BDNF; neurite outgrowth; neurological diseases; NGF genes; *Telosma cordata*

---

### Introduction

Dementia is a clinical syndrome primarily that predominantly manifests as a decline in cognitive functions such as memory, learning, thinking and social abilities. It has emerged as a significant social and

---

Received: 18 Aug 2023. Received in revised form: 25 Oct 2023. Accepted: 08 Nov 2023. Published online: 15 Nov 2023.

From Volume 49, Issue 1, 2021, Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca journal uses article numbers in place of the traditional method of continuous pagination through the volume. The journal will continue to appear quarterly, as before, with four annual numbers.

medical challenge that demands urgent attention to understand its underlying pathogenesis (Alzobaidi *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2010). According to the World Alzheimer Report 2022, the number of individuals worldwide suffering from dementia was estimated to be over 55 million, and this quantity is predicted to grow by about 50% in 2030 and further escalate to 139 million by 2050 (International, 2018). The percentage of citizens above the age of 65 with dementia stands at approximately 7%, while in developed countries, this rate is slightly higher, ranging from 8% to 10% due to longer life spans (Prince *et al.*, 2013; WHO, 2022).

Alzheimer's disease (AD) stands as the predominant manifestation of dementia, characterized by the accumulation of beta-amyloid (forming amyloid plaques) and the gradual deterioration of microtubules. This leads to the loss of synaptic connections, impaired communication, and the apoptosis of neuronal cells (Alzobaidi *et al.*, 2021). Although not entirely comprehended, the progression of the disease is believed to be connected to the presence of neurofibrillary tangles and senile plaques. These aggregates are composed of hyperphosphorylated tau protein and amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) of varying sizes, respectively (Balkrishna *et al.*, 2019). Especially, AD is associated with a substantial reduction in the levels of acetylcholine (ACh) due to increased breakdown. ACh is a crucial neurotransmitter responsible for transmitting signals across synapses. After fulfilling its signaling role, ACh is hydrolyzed into choline and acetyl groups through the action of the enzyme acetylcholinesterase (AChE). The utilization of AChE inhibition as a promising therapeutic approach for the management of neurological disorders has been proposed. The abundance of plants in nature offers a promising source of AChE inhibitors (Pagliosa *et al.*, 2010; Seong *et al.*, 2017).

The implementation of neural-regeneration strategies aiming at reconstructing neuronal and synaptic networks holds potential as a therapeutic approach for AD. Neurogenesis, characterized by neurite outgrowth, is one of the neural-regeneration processes crucial for this purpose. It involves the branching of neurites, subsequent axonal, and dendritic elongation in maturing neurons. This fundamental process plays a vital role in constructing functional neuronal networks and is regarded as a hallmark of neuronal differentiation (Rangsinth *et al.*, 2021). Neurite outgrowth serves as a crucial initial step in the formation of the neuronal network. Therefore, drug discovery and development efforts targeted at promoting neurite outgrowth are an essential for understanding molecular mechanisms and developing effective treatments for axonal and synaptic damages (Gao *et al.*, 2019; Mitre *et al.*, 2017; Rigby *et al.*, 2020). Neurotrophic factors, which encompass Nerve Growth Factor (NGF), Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and acetyl H3 are known to extend neurite outgrowth in neuronal cells and play critical roles in the differentiation, survival, and function of neurons (Park *et al.*, 2015).

Recently, studies on natural compounds derived from medicinal plants, which are considered a new therapeutic agent for managing neurodegenerative diseases and neurological disorders, it has shown a dramatic increase. Many of these compounds have demonstrated their neurotrophic properties by inhibiting acetylcholinesterase and stimulating the growth of neurites in neuronal cells (Duangjan *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022; More *et al.*, 2012).

*Telosma cordata* (Burm. F.) Merr., commonly known as 'Thien ly' in Vietnam, is classified as a member of Apocynaceae family. This plant is primarily grown in Southeast Asia, with significant cultivation in countries such as Vietnam, Thailand, and Malaysia (Jing, 2014; Lim, 2014). *T. cordata* is not only collected for use as foods, but is also renowned for its medicinal properties (Wang *et al.*, 2022). It holds a significant place in traditional medicine, where its essential oils extracted from leaves are utilized for pain-removing, wound healing, scabies treatment, ulcer management, headache, and nerve relaxation (Jing, 2014). Moreover, *T. cordata* has been reported to possess antimicrobial (Buathong and Duangrisai, 2023), antidiabetic (Cajuday and Amparado, 2014), and antioxidant (Ngoitaku, 2016) properties. Studies have also suggested its capabilities to mitigate the danger of cardio-vascular disease, anti-cancers, and treating conjunctivitis (Huang *et al.*, 2010). Furthermore, in Vietnam, native people have used this plant as herbal tea to improve sleep quality, which suggests its potential as a supplement with sedative and neuroprotective effects. Chen Li *et al.* (2022)

demonstrated that the ethanol extract from *T. cordata* flowers (TCF) contained a total phenolic content of 40.51 mg GAE/g and indicated significant antioxidant activities. However, there was no mention of its neuronal protection activity, and the underlying molecular mechanisms involved in this effect remain incompletely understood elucidated.

Hence, in this report, our purpose was to investigate the acetylcholinesterase inhibitory activity, neurite outgrowth activity, and antioxidant activity of TCF extracts. Additionally, we examine the influence of TCF extracts on the expression of BDNF, NGF and acetyl H3 markers in C6 neuronal cells. The present results have provided insights into the molecular mechanisms related to cognitive improvement.

## Materials and Methods

### *Collection and identification of T. cordata*

We grabbed the samples of *T. cordata* in Sapa, Laocai province in South-west Vietnam in April 2021. The identification of *T. cordata* samples was based on a comparative morphological method following Endress *et al.*'s guidelines (Endress *et al.*, 2014). Additionally, DNA barcoding was used, and the nucleotide sequences of the *matK*, *trnH-psbA*, and *rbcL* genes were employed for identification purposes. The collected plant samples were dried to a constant weight and stored at temperature of -20 °C for the next experiments.

### *DNA extraction, PCR amplification, and sequencing for identification of samples*

We employed the CTAB method with a slight modification to extract the total DNA of *T. cordata* (Aboul-Maaty and Oraby, 2019). Then, we conducted the polymerase chain reaction (PCR) amplifications in 20 µL mixture using Phusa master mix 2× (Phusa Biochem, Vietnam). The primers utilized for sample identification were detailed as follows: *matK* (forward) 5'- ACCGTACTTTTATGTTTACGAGC -3' (reverse) 5'- TCCATCTGGAAATTTTCGTTCA-3', *trnH-psbA* (forward) 5'- CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC -3' (reverse) 5'- GTTATGCATGAACGTAATGCTC -3', *rbcL* (forward) 5'-GCA-AGTGTGTTGGATTCAAAGCTGGTG -3' (reverse) 5'- TGGTTGTGAGTTCACGTTCT -3'. The electrophoresis on a 1% agarose gel was carried out to examine the PCR products and purified using 100% ethanol. The *matK*, *trnH-psbA*, and *rbcL* fragments' nucleotide sequences were determined using Sanger method and analyzed based on the BLAST in NCBI (NCBI).

### *Preparation of T. cordata extracts*

The fresh flowering bodies of *T. cordata* were cut off and then freeze-dried for 48 hours. After drying, the samples were soaked in 90% ethanol. The ethanol extract was carried out through refluxing (55 °C-65 °C) and repeated three times. The ethanol solvent was subsequently removed by employing a rotary evaporator to yield the ethanol extract. The liquid-liquid extraction method was used to extract hexane, ethyl acetate, and butanol fractions from the samples following the modified Kwon *et al.* protocol (Seo *et al.*, 2016). Following that, each extract underwent low-pressure vaporization utilizing a rotary evaporator at 55 ± 2 °C).

### *Maintenance of neuronal cells*

The C6 cell line, derived from a rat glial tumor and procured from the American Type Culture Collection (ATCC; MD, USA), was nurtured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich). The medium was added 10% FBS (Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (100× concentration) under standard conditions of 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified environment.

*Acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity*

Each *T. cordata* extract was evaluated AChE inhibition by the modified Ellman's method (*El-Sayed et al.*, 2020; Youdim, 2022). Briefly, 10  $\mu$ L of the sample with different concentrations, 15  $\mu$ L of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.7), 125  $\mu$ L of 3 mM DTNB (17.838 mg of DTNB in 15 mL phosphate buffer, pH 7.7) and 25  $\mu$ L of 15 mM ACTI (21.675 mg in 5 mL of phosphate buffer, pH 7.7) were mixed. The mixture was placed in an incubator at a temperature of 37 °C for 10 minutes. After the pre-incubation, 25  $\mu$ L of enzyme AChE (0.22 U/mL) was added to the solution and incubated at 37 °C for 15 min. Enzyme activity was measured in a 96-well plate at 410 nm. The inhibition rate was calculated by following formula:

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \frac{A_S - A_B}{A_C - A_B} \times 100, \quad (1)$$

where  $A_S$ ,  $A_B$ ,  $A_C$  were the absorbance of the investigated extract sample, blank and control samples, respectively. The inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) were estimated based on monitoring the effect of increasing concentrations of these samples in the experiment on the inhibition values. The positive control used in the experiments was berberine chloride. All the assays were repeated three times (*Leimann et al.*, 2023).

*Neurite outgrowth*

The human glial C6 cell line was introduced into 24-well plates to reach the population of 8000 cells in each well. The plates, afterwards, was incubated overnight with various non-toxic concentrations of *T. cordata* extracts. Ethanol, ethyl acetate, butanol and hexane extracts of *T. cordata* were added at final concentrations of 2.5  $\mu$ g/mL and 5  $\mu$ g/mL. After a 24-hour incubation period, neurite length was observed and measured under 20 $\times$  magnification using a Nikon Eclipse Ti-U microscope from Japan). At least 5 randomly selected areas (100-200 cells/well) were captured in each well under the microscope (Nikon Eclipse Ti-U, Japan). Within these chosen regions, the length of neurite was examined in a total of 100 cells, employing ImageJ software. The experiments were repeated three times (*Rangsinth et al.*, 2021).

*Antioxidant activity using DPPH method*

The antioxidative potential of *T. cordata* extracts was assessed using the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging method as described in (*Chen et al.*, 2020), with the following modification. Different concentrations of *T. cordata* extracts (e.g. 10, 100, 250, 500, 1000  $\mu$ g/mL) were prepared in DMSO. Ascorbic acid (Vitamin C, from Sigma Co.) served as the standard antioxidant, and four different concentrations of vitamin C (4, 20, 50, 100  $\mu$ g/mL) were prepared in distilled deionized water. Each extract sample was mixed with 0.25  $\mu$ M DPPH solution in methanol. Subsequently, we incubated the resulted mixture in a dark chamber at room temperature for 30 min, prior to measuring the absorbance at 517 nm. The blank consists of 100  $\mu$ L of methanol and 100  $\mu$ L of DPPH. Finally, we determined the rate of inhibition by the following equation (2):

$$\text{Inhibition DPPH (\%)} = \frac{A_C - A_S}{A_C} \times 100, \quad (2)$$

where  $A_C$ ,  $A_S$  were the absorbance of the investigated control sample and extract sample, respectively.

*Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)*

To analyze the relative expression levels of *T. cordata* extract samples on the target genes, we conducted the qRT-PCR reaction. Total RNA from C6 cells was extracted using the Trizol method (Sigma Aldrich). A total of 1  $\mu$ L RNA was used in a 15  $\mu$ L first-strand cDNA synthesis with the GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA). Relative gene expression was measured using the GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, USA). The RT-PCR primer sequences were as follows: BDNF (forward) 5'- ACC CTG AGT TCC ACC AGG TG -3' (reverse) 5'- TGG GCG CAG CCT TCA T -3'; NGF (forward) 5'- TGG ACC CAA GCT CAC CTCA -3' (reverse) 5'- GGA TGA GCG CTT GCT CCT -3'; RPL (forward) 5'- TCAGACAGTGATTACACCGAGTTC -3' (reverse) 5'- GCCAGTAGAGACAAAAAGGCAAGA -



3'; GAPDH (forward) 5'-ATCACCATCTTCCAGGAGCGA-3' and (reverse) 5'-AGTTGTCATGGATGACCTTGGC-3'. The reaction was conducted following the manufacturer's instructions. qRT-PCR reactions and analyses were performed using Rotor-Gene Q (Qiagen, Düsseldorf, Germany) (Ashouri and Farshbaf Pourabad, 2021).

#### *Western blotting*

The hexane TCF extract was treated in C6 cells with different concentrations for 48 h. After that, this protein was collected by utilizing lysis buffer. To determine protein concentration, the Coomassie Protein Assay Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was employed. The following antibodies were used to detect neural factors: acetyl H3 (1:2000) (AH01432; Invitrogen, Waltham, MA, USA), BDNF (1:5000) (MA5-34960; Invitrogen, Waltham, MA, USA), NGF (1:1000) (N5415; SigmaAldrich, St. Louis, Missouri, USA). We used the  $\alpha$ -tubulin antibody (ab7291; Abcam, Cambridge, MA, USA) as a reference control. To detect the antibodies, we employed a secondary antibody that was linked to horseradish peroxidase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). This was followed by visualization using the Pierce™ ECL Western Blotting Substrate Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Following, the luminescence imaging was performed with the Image Quant LAS 500 system. Quantitation of bands was performed using ImageJ software. And then, the ratio between the density bands in each sample relative to the density of the reference control band was measured. All results were replicated in a minimum of three separate assays.

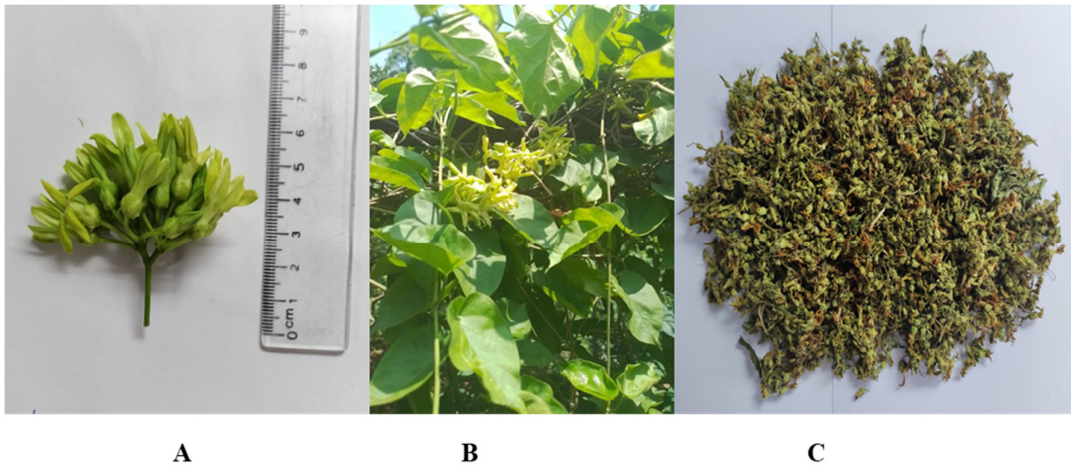
#### *Statistical analysis*

The results (mean  $\pm$  standard deviation (SD)) were obtained from three separate measurement. We then used both Student's t-test and one-way analysis of variance (ANOVA) to perform statistical evaluations, followed by GraphPad Prism 10 software. The p-value below 0.05 was considered statistically significant.

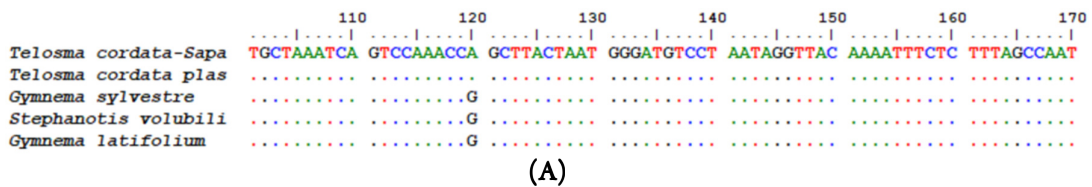
## Results

### *The identification of *Telosma cordata* species from collected samples in Sapa, Laocai, Vietnam*

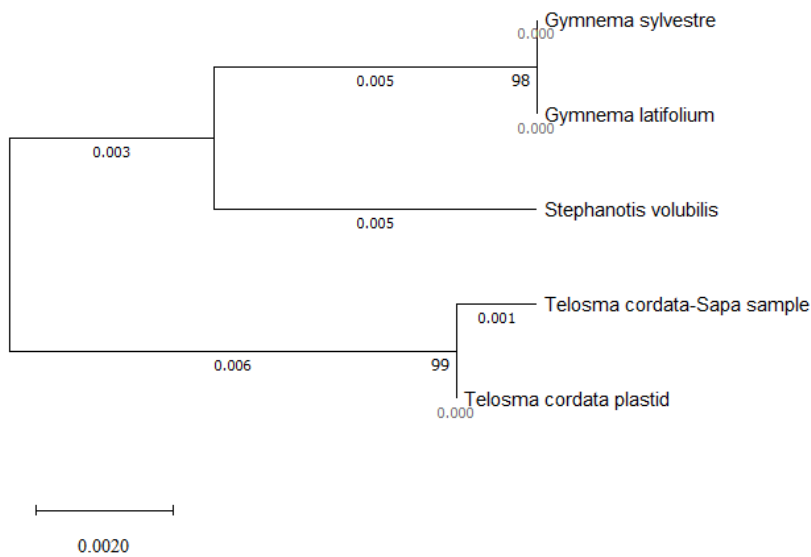
Plant samples were collected from Sapa, Laocai, Vietnam, in different areas based on morphological characteristics. As shown in Figure 1 (A-C), the obtained samples were identified as the *Telosma cordata* species through a comparative morphological method following by Endress *et al.* (2014). Moreover, the samples were molecularly identified using DNA barcoding. The results demonstrated successfully amplification of the medicinal plant samples using primer pairs specific to the three DNA barcoding regions. The nucleotide sequence lengths of the plant samples for the three regions of the *matK*, *trnH-psbA*, and *rbcL* genes are 883 bp, 513 bp, and 573 bp, respectively. The obtained sequences from the collected samples were tested for similarity with the available sequences on Genbank using the BLAST tool. The Figure 2 (A-B) showed that the sample sequences of the three barcode genes closely aligned with the reference database, indicating high similarity to species in genus *Telosma*. Specifically, the *matK* region possessed the highest identification efficiency of 99.42% with *Telosma cordata plastid* species, partial genome (GenBank accession number **KF539853.1**), and *Telosma cordata maturase (matK)* gene, partial cds – DQ660551.1 - (99.42%) based on Genbank on the NCBI website (Figure 2B). In addition, when comparing the *rbcL* sequences extracted from the Sapa samples with the *rbcL* sequence of *Telosma cordata* (GenBank accession number KF539853.1), a notable similarity percentage of 99.46% was uncovered. Moreover, similar results were observed with *trnH-psbA* barcode, with a sequence similarity of 97.63% to *Telosma cordata plastid* species, partial genome (KF539853.1), *Telosma accedens* – MW226392.1 (90.00%), and *Telosma pallida* – MW226393.1 (86.50%). These results conclude that the collected medicinal plant samples are members of the genus *Telosma*, specifically belonging to the species *Telosma cordata*.



**Figure 1.** Some morphological characteristic of (A) *T. cordata* flower: the *T. cordata* flower after harvested, (B) flowers, leaves and trunk of plants at the mature stage, (C) dried flowers



(A)



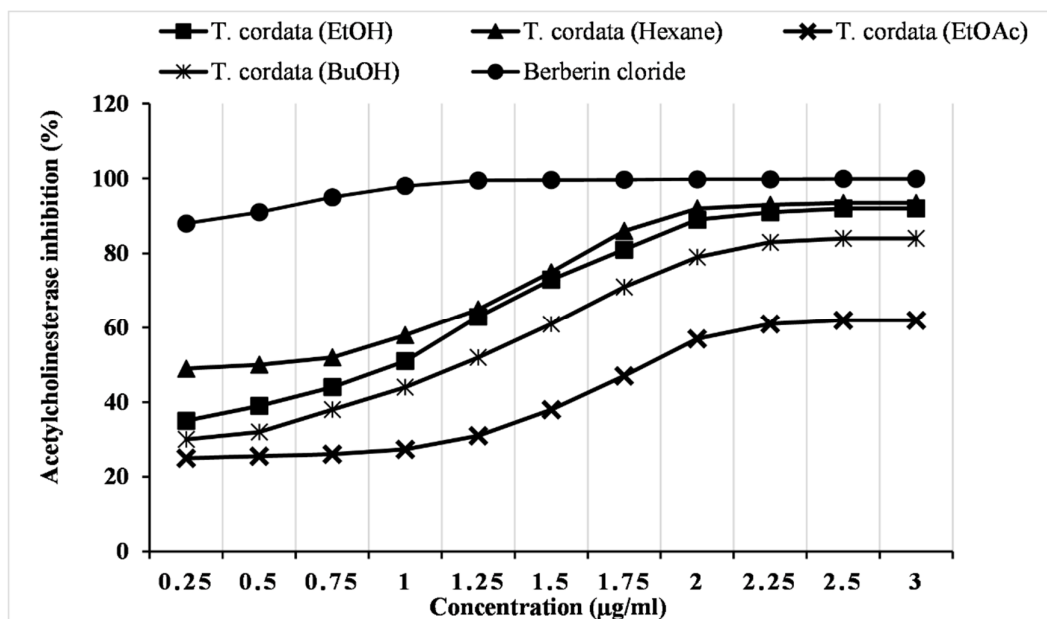
(B)

**Figure 2.** (A) Alignment of maturase (matK) barcode region of five species (B) Phylogenetic tree of 4 species from a comparison of sample nucleotide sequences using MEGA method

*Inhibition of acetylcholinesterase (AChE) by Telosma cordata extracts*

To screen for inhibitors from *TCF* extracts, we carried out testing of the AChE inhibitory activities of the extracts using *in vitro* Ellman assay, with berberine chloride as a positive control. The results are presented in Figure 3. The inhibitory activity of *T. cordata* extracts against AChE demonstrated a dose-dependent pattern. The IC<sub>50</sub> determinations confirmed that all four extracts were able to inhibit AChE to different levels,

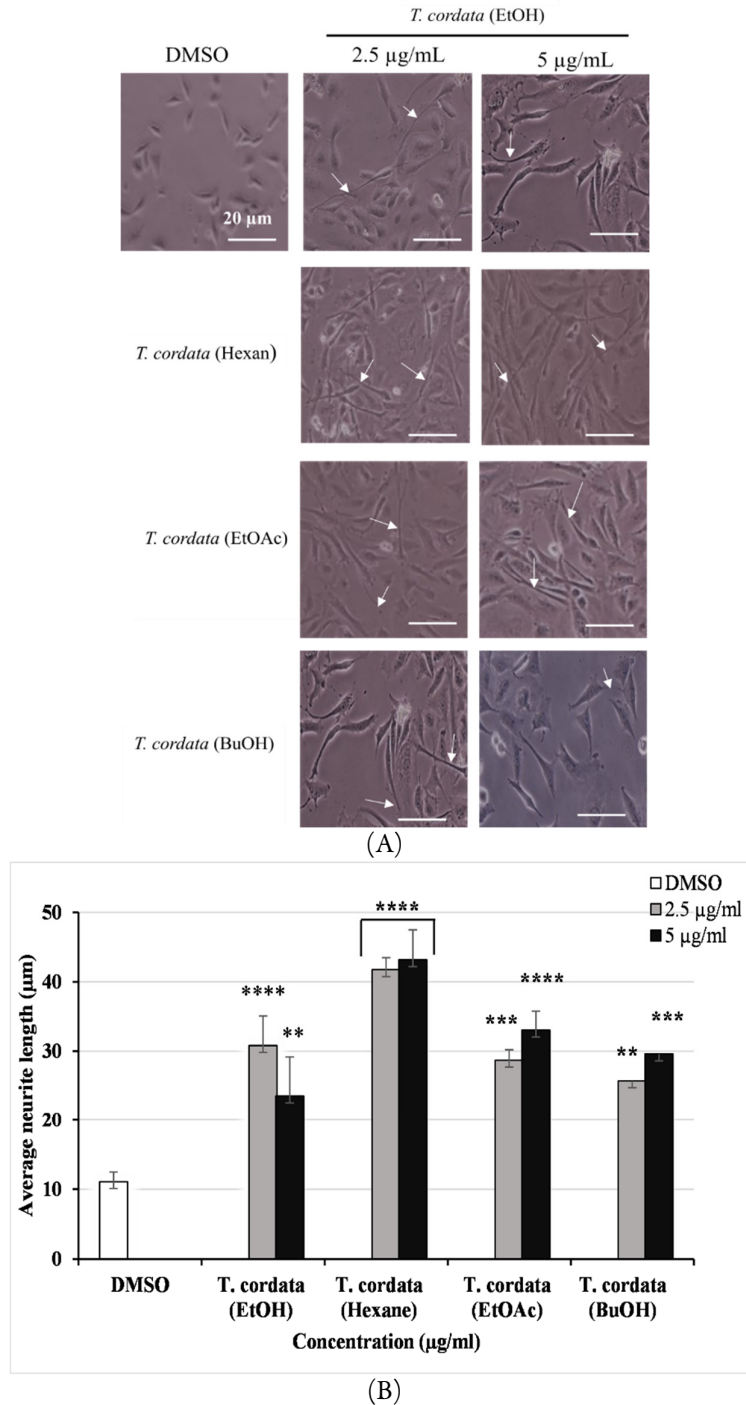
with the following order of potency: EtOAc > BuOH > EtOH > hexane > berberine chloride. As shown in Figure 3, *T. cordata* (EtOH) and *T. cordata* (BuOH) extracts inhibited AChE at IC<sub>50</sub> values of 8.352 ± 0.12 µg/mL and 13.474 ± 0.48 µg/mL, respectively. *T. cordata* (hexane) extract exhibited the strongest AChE inhibitory potency, displaying an IC<sub>50</sub> value of 6.196 ± 0.02 µg/mL. Conversely, the AChE inhibitory activity of *T. cordata* (EtOAc) extract was the weakest, demonstrating an IC<sub>50</sub> value of 67.546 ± 3.78 µg/mL. These results reveal that *TCF* extracts have a good activity for AChE inhibition.



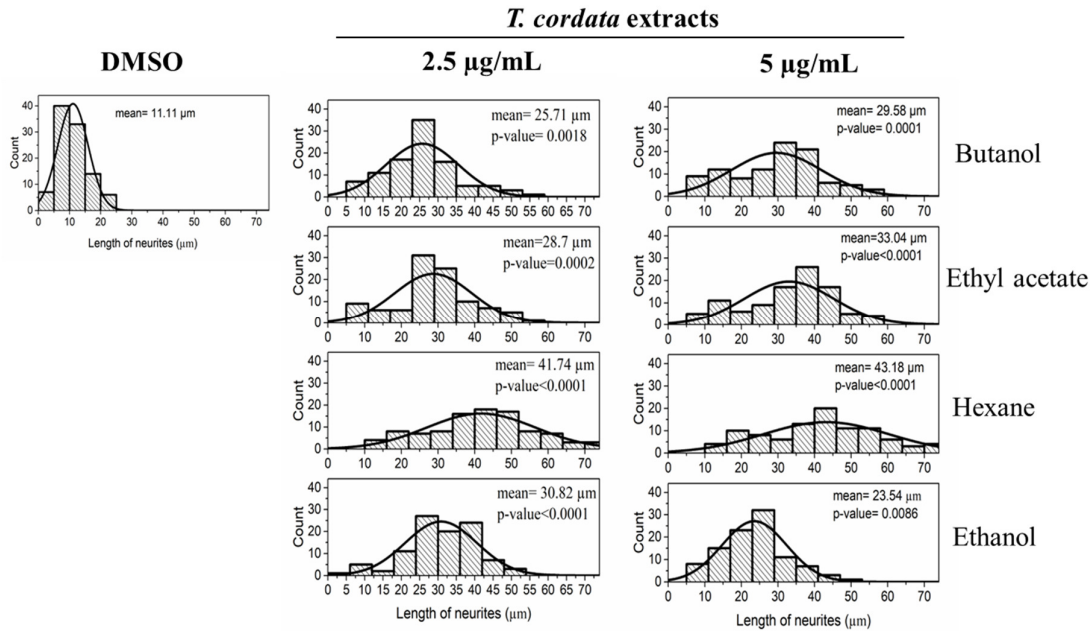
**Figure 3.** Percentage inhibition of acetylcholinesterase by the different fraction of the *T. cordata* extracts and Berberine chloride

#### *Hexane extract of Telosma cordata enhances neurite outgrowth*

To evaluate the impact of herbal extracts on neurite outgrowth, the C6 cells were exposed to two distinct concentrations of *T. cordata* extracts (2.5 µg/mL and 5 µg/mL) and observed using a confocal microscope at 20× magnification. As a negative control, dimethyl sulfoxide (DMSO) was employed. Neuronal morphology was observed following treatment with varying concentrations for 24 hours, as depicted in Figure 4A and B. The results showed that *T. cordata* extracts significantly increased the average neurite length compared to 0.1% DMSO control. At a concentration of 2.5 µg/mL, the hexane extract displayed the highest neurite outgrowth-promoting activities, while the BuOH extract showed the lowest neurite outgrowth-promoting activities, with average neurite length of 41.74 ± 4.26 µm and 25.71 ± 1.49 µm, respectively. Similarly, at a concentration of 5 µg/mL, the hexane extracts still had the highest neurite outgrowth-promoting activities, while the EtOH extract showed the lowest neurite outgrowth-promoting activities, with average neurite length of 43.18 ± 5.62 µm and 23.54 ± 2.43 µm, respectively (Figure 4B). The data shown in Figure 5 performs that the C6 cell numbers treated with *T. cordata* extracts were found to be considerably increased about neurite lengths in comparison with control cells. The herbal medicinal extracts exhibited a concentration-dependent enhancement in neurite outgrowth-promoting activity. Therefore, the hexane extract demonstrated the strongest neurite outgrowth-extending activities at both concentrations of 2.5 µg/mL and 5 µg/mL. Hence, we selected *T. cordata* (hexane) for the subsequent assays.



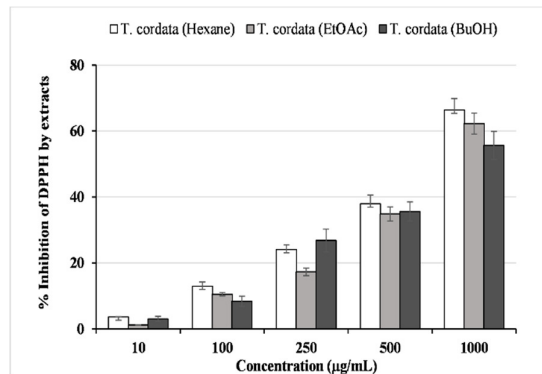
**Figure 4.** *Telosma cordata* extracts for neurite promoting activity in C6 cells. A: Immuno-stained image of C6 cells showed neurite outgrowth following treatment with *T. cordata* extracts (at different concentrations), and 0.1% DMSO (vehicle) Scale bar represents 20 µm. Photomicrographs of representative microscope fields were taken with a 20× objective. B: Graph describing the average length of neurites and optimized concentration of *T. cordata* extracts. Neurites were measured using ImageJ software on bright-field images of C6 cells, taken 48h after treatment. Statistical significance compared with vehicle: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 and \*\*\*\*p < 0.0001 (ANOVA). Data points represent the mean ± SD, N=100.



**Figure 5.** Histograms of neurite length of C6 cells following treatment with *T. cordata* extracts at different concentrations, and 0.1% DMSO (vehicle). The values of mean length  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) are shown in parentheses  
Differences between groups were examined for statistical significance using the Graphpad prism method

*Antioxidant activity of Telosma cordata extracts*

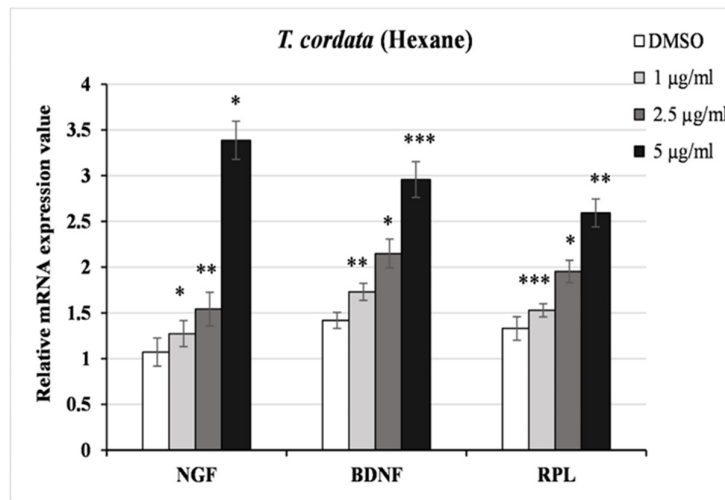
The antioxidant activity of *Telosma cordata* extracts was assessed using the DPPH method. Figure 6 illustrate the antioxidant capacity of *T. cordata* hexane, ethyl acetate and butanol extracts, respectively, for scavenging DPPH radicals. All three *T. cordata* extract samples (hexane, ethyl acetate, and butanol) showed lower IC<sub>50</sub> values of 0.713, 0.781, and 0.827 mg/mL, respectively, compared to the reference standard, vitamin C (0.012 mg/mL). Amongst the extracts, the hexane extract displayed the highest antioxidant activity, as evidenced by its lowest IC<sub>50</sub> value (0.713 mg/mL). The significant antioxidant activity of these *T. cordata* extracts suggests that they are rich in antioxidants that effectively inhibit the DPPH free radicals. These antioxidants are likely polyphenolic compounds, well-known for their efficient free radical scavenging abilities (Platzer *et al.*, 2022). This result indicates that *Telosma cordata* extracts hold significant potential as a valuable and potent natural source of antioxidants.



**Figure 6.** Antioxidant activity of *T. cordata* extracts at different concentration based on DPPH method  
Ascorbic acid was used as a positive control

*Hexane extract of Telosma cordata enhanced the neural-related gene expression*

To investigate the effective neuroprotective activity of *T. cordata* (hexane) extract, we further examined its ability to modulate the expression of neuroprotective genes, including NGF, BDNF, and RPL. The relative gene expression levels were quantified as fold changes in the treated groups relative to the untreated control using RT-PCR (Figure 7). The RT-PCR results revealed that the expression of NGF exhibited a dose-dependent augmentation in the treated groups subjected to *T. cordata* (hexane) extract, with fold changes of  $1.27 \pm 0.24$ ,  $1.54 \pm 0.28$  and  $3.39 \pm 0.41$  for concentrations of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively, compared to controls (DMSO), which showed a fold change of  $1.07 \pm 0.15$  (Figure 7). Following 24-hour treatment of the cells with different concentrations of *T. cordata* (hexane) extract, there was a substantial increase in NGF expression. The results of the gene expression analysis are presented in Figure 7.



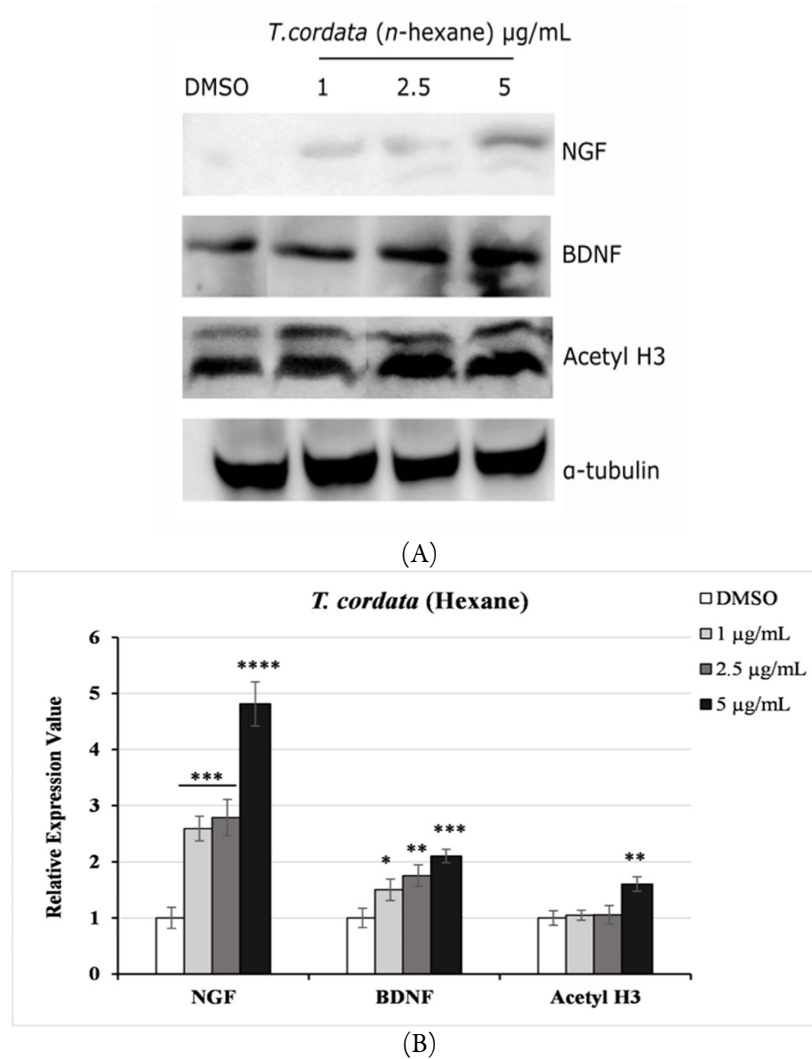
**Figure 7.** Extension of mRNA transcript levels of neurotrophic factor genes by *T. cordata* extracts (*T. cordata* hexan 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; *T. cordata* hexan 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; *T. cordata* hexan 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

Relative mRNA expression of markers NGF, BDNF and RPL on C6 cells after treatment with different concentrations of hexane extract of *T. cordata*. Quantitative data were obtained from three independent experiments. Data are presented as the Mean  $\pm$  SD. Statistical significance between control treated samples was analyzed using ANOVA. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$  vs. DMSO-treated C6 cells.

*Hexane extract of Telosma cordata promoted the neural-related protein expression*

To determine whether hexane extract of *Telosma cordata* affects the expression of neural cell markers, we assessed the protein levels of BDNF, NGF, and acetyl H3 in C6 cells. As depicted in Figure 8A-B, the NGF levels increased dramatically by approximately five-fold in cells treated with TCF (hexane) extract at 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Likewise, other neural cell markers, BDNF and histone H3, showed significant growth at the same concentration, increasing approximately two-fold and 1.6-fold, respectively. These findings demonstrate that the herbal extract significantly influences the expression of all these markers. Thus, these results indicated that TCF (hexane) extract can enhance the expression of neurology-related proteins.





**Figure 8.** Effects of hexane extract of *T. cordata* on neural-related protein expression. (A) Western blot analysis of neural cell markers nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and acetyl H3 in C6 cells treated with hexane extract of *T. cordata* with different concentration. (B) Quantitative analysis of the protein expression levels of neural cell markers NGF, BDNF, and acetyl H3 in C6 cells treated with different concentration of hexane extract of *T. cordata*

Quantitative data were obtained from three independent experiments. Data are presented as the Mean ± SD. Statistical significance between control treated samples was analyzed using ANOVA. \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001; \*\*\*\**p* < 0.0001 vs. DMSO-treated C6 cells.

## Discussion

In our study, we present a fast and convenient identification system for plants based on DNA analysis. DNA barcoding demonstrates potential as a practical and standardized method for species-level identification of both fungal and plant species. Its effectiveness relies heavily on the establishment of high-quality sequence databases (Bruni *et al.*, 2010; Fernández Moriano *et al.*, 2015). As part of our DNA barcode identification process, we used three different DNA barcode regions: *mat K*, *rbcL*, and *trnH-psbA*, to successfully identify multiple species (Begerow *et al.*, 2010). These findings from this study suggest that the combination of

conventional core-barcode markers with the *trnH-psbA* spacer can be a valuable strategy for differentiating between closely related taxa (Lima *et al.*, 2018). The *trnH-psbA* region proves useful in characterizing honey from specific geographic areas with familiar flora. This region's limited representation in public databases, which play a key role in comprehensive analyses across various taxa, is noted (Loera-Sánchez *et al.*, 2020). Furthermore, the *matK* gene demonstrated seamless amplification and alignment in the species under study, revealing strong discriminatory abilities across different groups (Figure 1A). Saha *et al.* (2020) recognized the *matK* gene as a universal DNA barcode for flowering plants. In recent times, the previously study further supported its universality and suggested combining *matK* with *rbcL* as a universal DNA barcode for plants. Additionally, both *rbcL* and *trnH-psbA* markers demonstrated easy amplification and sequencing, confirming their suitability for scientific applications in plant identification and diversity studies (Bruni *et al.*, 2015).

The acetylcholinesterase enzyme (AChE) which exists in two different forms within the brain, known as monomer (G1) and tetramer (G4), responsible for hydrolyzing acetylcholine in the nervous system. The G4 isoform, which makes up the majority of total AChE, is closely tied to cognitive function (Behl *et al.*, 2020; Ferlemi *et al.*, 2014; Martini *et al.*, 2018). Within the cholinergic anti-inflammatory pathway (CAP), AChE plays a vital role in modulating the interaction between ACh and  $\alpha 7$ nAChR (Abdullah *et al.*, 2019; Benfante *et al.*, 2021), which regulates immune responses in the brain. AChE inhibitors have been formulated and developed as potential therapeutic agents for managing dementia. In the previous study, another medicinal plant extract, Pei Li *et al.* indicated that the whole herbal extracts of *Dichocarpum auriculatum* also performed inhibitory activity of AChE by Ellman method (Li *et al.*, 2019). While our *T. cordata* extracts were evaluated for AChE inhibitory activity, we found that hexane extract of *T. cordata* showed a higher inhibition ( $IC_{50} = 6.196 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ ) than the previous result for the *D. auriculatum* extract ( $IC_{50} = 150 \mu\text{g/mL}$ ) (Li *et al.*, 2019). This result expresses the activity inhibitory of AChE and was lower than the positive control - berberine chloride ( $IC_{50} = 0.289 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ ). Thus, neuroprotective activity of *T. cordata* is interested and needs to be investigated further for neurological-related disease treatment. In this study, for the first time, we suggest that extracts isolated from the flowers of *Telosma cordata* induce neurite outgrowth in rat C6 cell lines. Especially, the average length of neurite was increased five time when cell treat with hexane extract of *T. cordata* compared with control. This effect could help to connect cells that are very far apart. Numerous previous studies have shown that neurite outgrowth can be induced by natural compounds alone or in combination with neurotrophic factors (Duangjan *et al.*, 2021; More *et al.*, 2012). Our study demonstrates that hexane extract of *T. cordata* possess strong neurite outgrowth-promoting activities in C6 cells.

NGF has a vital function in facilitating neuronal cell differentiation, survival, and the stimulation of neurite outgrowth (Bradshaw *et al.*, 2017). Due to its neurotrophic properties, NGF has emerged as a promising candidate for potential therapeutic interventions in neurodegenerative diseases, including dementia (Do Carmo *et al.*, 2021; Eu *et al.*, 2021; Triaca *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2019). Belonging to the neural family of growth factors, BDNF operates as a secreted protein that holds significance in bolstering the survival and expansion of neurons within both the central and peripheral nervous systems. Furthermore, BDNF signaling plays a pivotal role in the initial stages of development, governing the proliferation and differentiation of neuronal progenitors, cell survival, neurite outgrowth, as well as the dynamic establishment and refinement of synaptic connections (Allen *et al.*, 2013; Amen *et al.*, 2016; Arévalo and Deogracias, 2023). There is evidence supporting the involvement of histone modifications, particularly H3 and H4 acetylation, in neural stem or progenitor cell differentiation and neurotrophic. Furthermore, these neural differentiations are associated with histone deacetylase inhibitor (HDACi) induced neural differentiation and neurotrophic activity (Ngubo *et al.*, 2022). In our study, we observed a remarkable increase in BDNF, NGF and acetyl H3 mRNA and protein levels in C6 cells following treatment with TCF extracts, compared to vehicle treatment. These findings suggest that the TCF extracts may have a positive impact on neurotrophic factors and histone modifications, which could be beneficial for neuronal function and potential therapeutic strategies in neurodegenerative conditions.



Moreover, antioxidant activity plays significant importance role in the prevention or postponement of major degenerative diseases. Hence, we opted to assess the antioxidative potential of *T. cordata* extracts using the DPPH radical method. Our investigation revealed noteworthy antioxidant activity in all three extracts from *T. cordata*. The DPPH assay stands as a suitable tool for gauging the antioxidative capacity of extracts with lower polarity (Mercado-Mercado *et al.*, 2013). Flavonoids and terpenoids, prevalent in plants, are recognized as the main antioxidant compounds, and pivotal for their roles as radical scavengers, agents with reducing power, and chelators of metal ions (Saleem *et al.*, 2022). The observed antioxidant activity of the *T. cordata* extracts is likely attributable to the presence of flavonoids and terpenes in the samples. These compounds are commonly found in various plants known to exhibit antioxidant properties, as demonstrated in previous studies utilizing the DPPH method (Nguyen, 2020). Overall, our results indicate that *T. cordata* extracts possess significant antioxidant potential, which could contribute to their potential therapeutic benefits in combating oxidative stress and related degenerative diseases.

## Conclusions

In conclusion, this study demonstrated that *Telosma cordata* flower extracts have significant potential to improve neuronal survival and exhibited substantial anti-acetylcholinesterase, neurotrophic, and antioxidant activities. The treatment of C6 cells with *T. cordata* extracts resulted in enhanced gene expressions of BDNF, NGF, and RPL, as well as increased protein expression levels of BDNF, NGF and histone H3. These findings indicate that *T. cordata* has the potential to be promising candidate for developing of pharmacological drugs that can facilitate neuronal regeneration. In the future, we aim to isolate and identify the specific phytochemical compounds in *T. cordata* responsible for its neuroprotective effects in treating dementia and neurodegenerative diseases. This will provide valuable insights into the mechanisms responsible for its therapeutic properties, potentially paving the way for novel therapeutic interventions targeting neurological disorders.

## Authors' Contributions

Conceived and designed the experiments: TVN, DHN and NTD; Performed the experiments: NTD, TLTB, HTTPN and HMN; Analyzed the data: TVN, DHN, NTD and HTTPN; Wrote the paper: TVN, DHN, NTD and HMN. All authors read and approved the manuscript.

## Ethical approval (for researches involving animals or humans)

Not applicable.

## Acknowledgements

Ms. Doan Thi Nguyet was funded by the Master, PhD Scholarship Program of Vingroup Innovation Foundation (VINIF), code VINIF.2022.ThS.062.

This research is funded by Vietnam Academy of Science and Technology (No: CT0000.03/21-22).

## Conflict of Interests

The authors declare that there are no conflicts of interest related to this article.

## References

- Abdullah A, Maged M, Hairul-Islam MI, Osama IA, Maha H, Manal A, Hamza HJP (2019). Activation of aryl hydrocarbon receptor signaling by a novel agonist ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *PloS One* 14:e0215981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215981>
- Aboul-Maaty NAF, Oraby HAS (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre* 43:1-10. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1>
- Allen M, Bird C, Feng W, Liu G, Li W, Perrone-Bizzozero NI, Feng Y (2013). HuD promotes BDNF expression in brain neurons via selective stabilization of the BDNF long 3'UTR mRNA. *PloS One* 8:e55718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055718>
- Alzobaidi N, Quasimi H, Emad NA, Alhalmi A, Naqvi M (2021). Bioactive compounds and traditional herbal medicine: promising approaches for the treatment of dementia. *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease* 11:1-14. <https://doi.org/10.2147/dnnd.S299589>
- Amen AM, Pham DL, Meffert MK (2016). Post-transcriptional Regulation by brain-derived neurotrophic factor in the nervous system. In: Menon PKMJ, Goldstrohm PA (Eds). *Post-transcriptional Mechanisms in Endocrine Regulation*. (Cham: Springer International Publishing), pp 315-337. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-25124-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25124-0_14)
- Arévalo JC, Deogracias R (2023). Mechanisms controlling the expression and secretion of BDNF. *Biomolecules* 13:789. <https://doi.org/10.3390/biom13050789>
- Ashouri S, Farshbaf Pourabad R (2021). Regulation of gene expression encoding the digestive  $\alpha$ -amylase in the larvae of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) in response to plant protein extracts. *Gene* 766:145159. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145159>
- Balkrishna A, Pokhrel S, Tomer M, Verma S, Kumar A, Nain P, Gupta A, Varshney A (2019). Anti-acetylcholinesterase activities of mono-herbal extracts and exhibited synergistic effects of the phytoconstituents: A biochemical and computational study. *Molecules* (Basel, Switzerland) 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24224175>
- Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W (2010). Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87:99-108. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2585-4>
- Behl T, Kaur G, Bungau S, Jhanji R, Kumar A, Mehta V, Zengin G, Brata R, Hassan SSU, Fratila O (2020). Distinctive evidence Involved in the role of endocannabinoid signalling in Parkinson's disease: A perspective on associated therapeutic interventions. *International Journal of Molecular Sciences* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21176235>
- Benfante R, Di Lascio S, Cardani S, Fornasari D (2021). Acetylcholinesterase inhibitors targeting the cholinergic anti-inflammatory pathway: a new therapeutic perspective in aging-related disorders. *Aging Clinical and Experimental Research* 33(4):823-834. <https://doi.org/10.1007/s40520-019-01359-4>
- Bradshaw RA, Mobley W, Rush RA (2017). Nerve growth factor and related substances: A brief history and an introduction to the international NGF meeting series. *International Journal of Molecular Sciences* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18061143>
- Bruni I, De Mattia F, Galimberti A, Galasso G, Banfi E, Casiraghi M, Labra M (2010). Identification of poisonous plants by DNA barcoding approach. *International Journal of Legal Medicine* 124:595-603. <https://doi.org/10.1007/s00414-010-0447-3>
- Bruni I, Galimberti A, Caridi L, Scaccabarozzi D, De Mattia F, Casiraghi M, Labra M (2015). A DNA barcoding approach to identify plant species in multiflower honey. *Food Chemistry* 170:308-315. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.060>
- Buathong R, Duangsrirai SJP (2023). Plant ingredients in Thai food: a well-rounded diet for natural bioactive associated with medicinal properties. *PeerJ* 11:e14568. <https://doi.org/10.7717/peerj.14568>

- Cajuday L, Amparado E (2014). Hypoglycemic property of *Telosma procumbens* (Blanco) Merr. (Apocynaceae) in normal and alloxan-induced diabetic juvenile mice (*Mus musculus*). *Journal of Phytopharmacology* 3:113-117. <https://doi.org/10.31254/phyto.2014.3206>
- Chen X, Liang L, Han C (2020). Borate suppresses the scavenging activity of gallic acid and plant polyphenol extracts on DPPH radical: A potential interference to DPPH assay. *LWT* 131:109769. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109769>
- Do Carmo S, Kannel B, Cuello ACJC (2021). The nerve growth factor metabolic pathway dysregulation as cause of Alzheimer's cholinergic atrophy. *Cells* 11:16. <https://doi.org/10.3390/cells11010016>
- Duangjan C, Rangsinth P, Zhang S, Wink M, Tencomnao T (2021). *Anacardium occidentale* L. leaf extracts protect against glutamate/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative toxicity and induce neurite outgrowth: The involvement of SIRT1/Nrf2 signaling pathway and teneurin 4 transmembrane protein. *Frontiers in Pharmacology* 12:627738. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.627738>
- El-Sayed NF, El-Hussieny M, Ewies EF, Fouad MA, Boulos LS (2020). New phosphazine and phosphazide derivatives as multifunctional ligands targeting acetylcholinesterase and  $\beta$ -Amyloid aggregation for treatment of Alzheimer's disease. *Bioorganic Chemistry* 95:103499. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103499>
- Endress M, Liede-Schumann S, Meve U (2014). An updated classification for Apocynaceae. *Phytotaxa* 159. <https://doi.org/10.5167/uzh-93115>
- Eu WZ, Chen Y-J, Chen W-T, Wu K-Y, Tsai C-Y, Cheng S-J, Carter RN, Huang G-J (2021). The effect of nerve growth factor on supporting spatial memory depends upon hippocampal cholinergic innervation. *Translational Psychiatry* 11:162. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01280-3>
- Ferlemi AV, Avgoustatos D, Kokkosis AG, Protonotarios V, Constantinou C, Margarity M (2014). Lead-induced effects on learning/memory and fear/anxiety are correlated with disturbances in specific cholinesterase isoform activity and redox imbalance in adult brain. *Physiology & Behavior* 131:115-122. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.04.033>
- Fernández Moriano C, Divakar P, Crespo A, Gómez-Serranillos M (2015). Antioxidant and cytoprotective potentials of Parmeliaceae lichens and identification of active compounds. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 81:164-178
- Gao Y, Yan Y, Fang Q, Zhang N, Kumar G, Zhang J, Song L-J, Yu J, Zhao L, Zhang H-T (2019). The Rho kinase inhibitor fasudil attenuates A $\beta$ <sub>1-42</sub>-induced apoptosis via the ASK1/JNK signal pathway in primary cultures of hippocampal neurons. *Metabolic Brain Disease* 34:1787-1801. <https://doi.org/10.1007/s11011-019-00487-0>
- Huang WY, Cai YZ, Zhang Y (2010). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer* 62:1-20. <https://doi.org/10.1080/01635580903191585>
- International, A.s.D. (2018). *World Alzheimer Report 2018*. London (GB): ADI.
- Jing P, Yin Z, Yizhe S, Tao W, Jingya Y (2014). Preliminary exploration of a novel type high-efficiency mosquito-repellent compound essential oils. *Animal Husbandry and Feed Science* 6(4):170.
- Leimann FV, de Souza LB, de Oliveira BPM, Rossi BF, da Silva PS, Shiraishi CSH, Kaplum V, Abreu RM, Pereira C, Barros LJFRI (2023). Evaluation of Berberine nanoparticles as a strategy to modulate acetylcholinesterase activity. *Food Research International* 113295.
- Li P, Liu S, Liu Q, Shen J, Yang R, Jiang B, He C, Xiao PJ (2019). Screening of acetylcholinesterase inhibitors and characterizing of phytochemical constituents from *Dichocarpum auriculatum* (Franch.) WT Wang & PK Hsiao through UPLC-MS combined with an acetylcholinesterase inhibition assay *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology* 245:112185. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112185>
- Li X-W, Lu Y-Y, Zhang S-Y, Sai N-N, Fan Y-Y, Cheng Y, Liu Q-S (2022). Mechanism of neural regeneration induced by natural product LY01 in the 5 $\times$ FAD mouse model of Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology* 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.926123>
- Lim TK (2014). *Telosma cordata*. In: Lim TK (Ed). *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. Volume 7, Flowers. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp 107-110. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-7395-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7395-0_5)
- Lima RAF, Oliveira AA, Colletta GD, Flores TB, Coelho RLG, Dias P, Frey GP, Iribar A, Rodrigues RR, Souza VC (2018). Can plant DNA barcoding be implemented in species-rich tropical regions? A perspective from São Paulo State, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 41:661-670. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0282>

- Loera-Sánchez M, Studer B, Kölliker R (2020). DNA barcode trnH-psbA is a promising candidate for efficient identification of forage legumes and grasses. BMC Research Notes 13:35. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-4897-5>
- Martini F, Pesarico AP, Brüning CA, Zeni G, Nogueira CW (2018). Ebselen inhibits the activity of acetylcholinesterase globular isoform G4 in vitro and attenuates scopolamine-induced amnesia in mice. Journal of Cellular Biochemistry 119:5598-5608. <https://doi.org/10.1002/jcb.26731>
- Mercado GM, de la Rosa Carrillo LA, Medrano AW, Díaz JAL, Parrilla EÁ (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. Nutrición hospitalaria: Organo oficial de la Sociedad española de nutrición parenteral y enteral 28(1):36-46. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6298>
- Mitre M, Mariga A, Chao MV (2017). Neurotrophin signalling: novel insights into mechanisms and pathophysiology. Clinical Science 131(1):13-23. <https://doi.org/10.1042/CS20160044>
- More SV, Koppula S, Kim I-S, Kumar H, Kim B-W, Choi D-K (2012). The role of bioactive compounds on the promotion of neurite outgrowth. Molecules (Basel, Switzerland) 17:6728-6753. <https://doi.org/10.3390/molecules17066728>
- NCBI Basic local alignment search tool (Blast) Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information.
- Ngoitaku C, Riangwong K (2016). Total phenolic content and antioxidant activities of edible flower tea products from Thailand. International Food Research Journal 23:2286-2290.
- Ngubo M, Reid JL, Patterson HG. (2022). Distinct structural groups of histone H3 and H4 residues have divergent effects on chronological lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. PloS One 17:e0268760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268760>
- Nguyen MP (2020). Investigations on the processing and production of herbal tea from Pakalana *Telosma cordata*, flowers using blanching and drying. Bioscience Biotechnology Research Communications 13:781-786
- Pagliosa LB, Monteiro SC, Silva KB, de Andrade JP, Dutilh J, Bastida J, Cammarota M, Zuanazzi JA (2010). Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on in vitro acetylcholinesterase activity. Phytomedicine 17:698-701. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.10.003>
- Park SJ, Jin ML, An HK, Kim KS, Ko MJ, Kim CM, Choi YW, Lee YC (2015). Emodin induces neurite outgrowth through PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ -mediated signaling pathways in Neuro2a cells. Neuroscience Letters 588:101-107. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.01.001>
- Platzer M, Kiese S, Tybussek T, Herfellner T, Schneider F, Schweiggert-Weisz U, Eisner PJ (2022). Radical scavenging mechanisms of phenolic compounds: A quantitative structure-property relationship (QSPR) study. Frontiers in Nutrition 663. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.882458>
- Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP (2013). The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. Alzheimer's & Dementia: the Journal of the Alzheimer's Association 9:63-75.e62. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>
- Rangsinth P, Duangjan C, Sillapachaiyaporn C, Isidoro C, Prasansuklab A, Tencomnao T (2021). *Caesalpinia mimosoides* leaf extract promotes neurite outgrowth and inhibits BACE1 activity in mutant APP-overexpressing neuronal Neuro2a Cells. Pharmaceuticals (Basel, Switzerland) 14. <https://doi.org/10.3390/ph14090901>
- Rigby MJ, Gomez TM, Puglielli L (2020). Glial cell-axonal growth cone interactions in neurodevelopment and regeneration. Frontiers in Neuroscience 14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00203>
- Saha K, Dholakia BB, Sinha RK, Sinha S (2020). DNA barcoding of selected Zingiberaceae species from North-East India. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 29(3):494-502. <https://doi.org/10.1007/s13562-020-00563-y>
- Saleem A, Naureen I, Naeem M, Tasleem G, Ahmed H, Farooq U (2022). Therapeutic role of *Piper nigrum* L (Black Pepper) and pharmacological activities. Scholars International Journal of Biochemistry 5:15-21. <https://doi.org/10.36348/sijb.2022.v05i01.003>
- Seo JE, Park JE, Lee JY, Kwon H (2016). Determination of seven N-nitrosamines in agricultural food matrices using GC-PCI-MS/MS. Food Analytical Methods 9:1595-1605. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0335-z>
- Seong SH, Ali MY, Kim HR, Jung HA, Choi JS (2017). BACE1 inhibitory activity and molecular docking analysis of meroterpenoids from *Sargassum serratifolium*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 25:3964-3970. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.05.033>

- Triaca V, Ruberti F, Canu N (2021). NGF and the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease: from molecular players to neuronal circuits. *Recent Advances in NGF and Related Molecules: The Continuum of the NGF "Saga"*, 145-165.
- Wang S, Tang C, Luo F, Shao Y, Lei J, Lu C, ... Jiang X (2022). The study of phenolics from *Telosma cordata* (Burm. f.) Merr. flowers as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors: *in-vitro* assessment and molecular docking. *Archives of Clinical Psychiatry* 49(3). <https://doi.org/10.15761/0101-60830000000434>
- Wang Y, Huang LQ, Tang XC, Zhang HY (2010). Retrospect and prospect of active principles from Chinese herbs in the treatment of dementia. *Acta Pharmacologica Sinica* 31:649-664. <https://doi.org/10.1038/aps.2010.46>
- WHO (2022). Dementia. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Xu D, Wu D, Qin M, Nih LR, Liu C, Cao Z, ... Lu Y (2019). Efficient delivery of nerve growth factors to the central nervous system for neural regeneration. *Advanced Materials* 31:1900727. <https://doi.org/10.1002/adma.201900727>
- Youdim MB (2022). Site-activated multi target iron chelators with acetylcholinesterase (AChE) and monoamine oxidase (MAO) inhibitory activities for Alzheimer's disease therapy. *Journal of Neural Transmission* 129(5-6):715-721. <https://doi.org/10.1007/s00702-022-02462-z>



The journal offers free, immediate, and unrestricted access to peer-reviewed research and scholarly work. Users are allowed to read, download, copy, distribute, print, search, or link to the full texts of the articles, or use them for any other lawful purpose, without asking prior permission from the publisher or the author.



**License** - Articles published in *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* are Open-Access, distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) License.  
© Articles by the authors; Licensee UASVM and SHST, Cluj-Napoca, Romania. The journal allows the author(s) to hold the copyright/to retain publishing rights without restriction.

**Notes:**

- **Material disclaimer:** The authors are fully responsible for their work and they hold sole responsibility for the articles published in the journal.
- **Maps and affiliations:** The publisher stay neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.
- **Responsibilities:** The editors, editorial board and publisher do not assume any responsibility for the article's contents and for the authors' views expressed in their contributions. The statements and opinions published represent the views of the authors or persons to whom they are credited. Publication of research information does not constitute a recommendation or endorsement of products involved.